

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kristýna Panušková

**Porovnání reflexních a operantních metod při vyšetření efektu léčby
u modelu neuropatické bolesti**

*Comparison of reflex-based and operant methods when evaluating effects
of treatment on pain in experimental models*

Diplomová práce

Školitel: doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 4. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. MVDr. Šimonu Vaculínovi, Ph.D za obrovskou vstřícnost, cenné rady a připomínky, které mi pomohly při zpracování diplomové práce.

Abstrakt

Farmakologická léčba neuropatické bolesti je stále nedostačující. Methylfenidát, psychostimulant zvyšující hladinu dopaminu a noradrenalinu, je používaným lékem u syndromu ADHD. U pacientů s ADHD léčených methylfenidátem byly zaznamenány změny v prahu bolesti. Cílem této práce bylo zjistit, zda methylfenidát ovlivní periferní neuropatickou bolest. Neuropatická bolest byla modelována u laboratorních potkanů metodou chronické konstriktce ischiadického nervu. Efekt methylfenidátu na evokovanou složku bolesti byl hodnocen u kontrolních zvířat a u zvířat s neuropatickou bolestí reflexními (plantar test, vonFrey test) i operantními testy (metoda teplotní podmíněné preference). Efekt methylfenidátu na spontánní složku bolesti byl hodnocen operantní metodou podmíněné preference místa. Tato studie prokázala, že methylfenidát v aplikační dávce 1 mg/kg má antialodynický efekt, avšak nepůsobí antinociceptivně. Dále jsme v této práci potvrdili, že methylfenidát v této nízké dávce nepůsobí jako atraktant a nemá vliv na spontánní bolest. Nakonec jsme porovnali jednotlivé metodiky měření bolesti a dospěli k závěru, že plantar test není vhodnou metodou pro evaluaci účinku analgetik.

Klíčová slova:

plantar test, vonFrey test, termální preference místa, podmíněná preference místa, vyšetření bolesti, neuropatická bolest, chronická konstriktce sedacího nervu, methylfenidát

Abstract

Pharmacological treatment of neuropathic pain is still insufficient. Methylphenidate, a psychostimulant that increases the dopamine and noradrenaline levels, is commonly used for treating ADHD. There have been reports of changes in patients pain thresholds by ADHD patients treated with methylphenidate. The aim of the study is to examine if methylphenidate can affect peripheral neuropathic pain. Neuropathic pain has been modelled on laboratory rats by chronic constriction of the ischiatic nerve. The effect of methylphenidate on the evoked pain component was evaluated on control animals and on animals with neuropathic pain using reflex (plantar test, vonFrey test) and operanting test (thermal place preference). The effect of methylphenidate on the spontaneous components of pain was evaluated using the methods of conditioned place preference. This study has proven that methylphenidate in an applicable dose of 1 mg/kg has an antialodynic effect but does not act antinociceptively. This study further confirms that methylphenidate in low doses does not act as attractant and has no effect on spontaneous pain. The last part of the study compares the different methods for pain measurement and comes to the conclusion that the plantar test is not an adequate method for evaluating the effect of analgesics drugs.

Key words:

plantar test, vonFrey filaments test, thermal place preference, conditioned place preference, pain evaluation, neuropathic pain, chronic constriction injury, methylphenidate

Obsah

1. Úvod	1
2. Bolest	2
2.1 Nocicepce	3
2.2 Senzory bolesti	4
2.3 Vedení informace primárním nociceptorem	5
2.4 Dráhy nocicepce a bolesti	6
2.4.1 Antinociceptivní systém	7
3. Neuropatická bolest	9
3.1 Buněčné aspekty	9
3.2 Psychologické aspekty	12
4. Modely neuropatické bolesti	13
4.1 Chronická konstriktce ischiadického nervu	14
5. Měření bolesti	16
5.1 Testy evokované bolesti	16
5.1.1 Měření bolesti evokované tepelnou stimulací	18
5.1.1 Měření bolesti evokované mechanickou stimulací	20
5.2 Testy spontánní bolesti	20
5.2.1 Metoda podmíněné preference místa (CPP)	21
6. Methylenfenidát	22
7. Cíle práce	24
8. Materiál a metody	25
8.1 Zvířata	25
8.2 Design experimentu	25
8.3 Methylenfenidát	26
8.4 Modelace neuropatické bolesti	26
8.5 Měření tepelného prahu bolesti	27
8.6 Měření mechanického prahu bolesti	28

8.7	Metoda teplotní preference	28
8.8	Metoda podmíněné preference místa	29
9.	Statistika	29
10.	Výsledky	30
10.1	Vliv CCI na evokovanou bolest	30
10.1.1	Vliv CCI na evokovanou bolest měřenou reflexními testy	30
10.1.2	Vliv CCI na evokovanou bolest měřenou operantní metodou TPP	34
10.2	Vliv methylfenidátu na evokovanou bolest	36
10.2.1	Vliv methylfenidátu na evokovanou bolest měřenou reflexními testy	36
10.2.2	Vliv methylfenidátu na evokovanou bolest měřenou operantním testem TPP	42
10.3	Efekt CCI na spontánní bolest	44
11.	Diskuze	46
11.1	Efekt CCI na evokovanou bolest	47
11.2	Efekt methylfenidátu na tepelně evokovanou bolest měřenou Hargreavesovým plantar testem	48
11.2.1	Kontrolní skupina	48
11.2.2	Skupina CCI	49
11.3	Efekt methylfenidátu na tepelně evokovanou bolest měřenou metodou TPP	50
11.3.1	Kontrolní skupina	50
11.3.2	Skupina CCI	51
11.4	Efekt methylfenidátu na mechanicky evokovanou bolest měřenou vonFreyovým testem	52
11.4.1	Kontrolní skupina	52
11.4.2	Skupina CCI	52
11.5	Efekt methylfenidátu na spontánní bolest	53
11.6	Porovnání reflexních a operantních metod při hodnocení efektu methylfenidátu	55
12.	Závěr	59
	Seznam použité literatury	60

Seznam zkratek

ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
CCI	Chronic constriction injury
CFA	Complete Freund's adjuvant
CNS	Centrální nervový systém
CPP	Condition place preference
DAT	Dopaminový transportér
DNIC	Diffuse noxious inhibitory control
DRG	Dorsal root ganglion
GABA	Gamma-Aminobutyric acid
IASP	International association for the study of pain
NET	Noradrenalinový transportér
PAG	Periakveduktální šed'
SEM	Standard error of the mean
TPP	Thermal place preference
VTA	Ventral tegmental area

1. Úvod

Bolest jako obranný mechanismus nás má informovat o skutečném nebo potenciálním poškození tkáně. Avšak u neuropatické bolesti se ochranná funkce ztrácí a samotná bolest se tak stává vlastní nemocí. Neuropatická bolest vznikající v důsledku léze či onemocnění somatosenzorického nervového systému postihuje zhruba 7-10 % populace. I přesto, že bylo provedeno mnoho výzkumů zaměřených na léčbu neuropatické bolesti, její farmakoterapie má stále velmi omezený úspěch. Jedním z důvodů může být použití nevhodných testů bolesti u zvířat. Pro evaluaci léčiv se nejvíce používají reflexní testy, zatímco operantní testy nejsou příliš časté. Reflexními testy se končetina zvířete stimuluje nejčastěji tepelným či mechanickým podnětem do vyvolání flexorového obranného reflexu. Operantní metody nám umožňují hodnotit subjektivní vnímání bolesti.

V několika studiích bylo prokázáno, že psychostimulační látky potencují analgetické vlastnosti opioidů. Patří mezi ně i methylfenidát, což je psychostimulant, který se v klinické praxi využívá u dětí a dospívajících k léčbě poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD). Nedávné studie uvedly, že pacienti s ADHD léčení methylfenidátem mají zvýšený práh bolesti. Dosud nebyla provedena žádná studie testující účinek methylfenidátu na periferní neuropatickou bolest u zvířat.

Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit efekt methylfenidátu na evokovanou bolest u skupiny potkanů s neuropatickou bolestí a u kontrolní skupiny. Druhým cílem práce bylo zhodnotit efekt methylfenidátu na spontánní bolest. Třetím cílem práce bylo porovnat výsledky jednotlivých metodik měření bolesti.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. Bolest

Bolest je definována dle Mezinárodní asociace pro studium bolesti (IASP) jako „nepříjemný smyslový a emocionální zážitek spojený se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo je popisovaná výrazy takového poškození“. Z této definice vyplývá, že bolest je subjektivním vjemem, který se liší u každého pacienta, nelze ji objektivně posuzovat a je v různé míře ovlivněná biologickými, psychologickými a sociálními faktory (IASP, 2018).

Tuto definici nelze použít u zvířat kvůli jejich verbální neschopnosti bolest sdělit, proto definujeme bolest u zvířat jako „nepříjemnou senzorickou a emocionální zkušenost, která vyvolává obranné reflexy, podmiňuje únikovou reakci, a která může ovlivnit druhově specifické rysy chování, např. sociální chování“ (Kitchell, 1987, cit. podle Franěk a Vaculín, 2012). Při testování bolesti u zvířat musíme brát v úvahu, že můžeme bolest pouze hodnotit z chování podobnému bolesti (autory označováno jako pain like behavior) jako je například automutilace, pokusy o únik z prostředí při tepelných testech apod. (Le Bars et al., 2001; Sandkühler, 2009).

V srpnu roku 2019 byla navržena nová definice, která popisuje bolest jako „averzivní senzorickou a emocionální zkušenost, obvykle způsobenou skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo připomínající takové poškození. Dodatek k této zatím neoficiální definici uvádí, že slovní popis je pouze jedním z několika projevů bolesti; neschopnost komunikovat nepopírá možnost, že člověk nebo zvíře cítí bolest. Bolest a nocicepce jsou různé jevy: zážitek bolesti nelze omezit pouze na aktivitu senzorických drah (IASP, 2019).

Bolest lze dělit podle několika parametrů. Dle délky trvání rozlišujeme bolest akutní a chronickou. Akutní krátkodobá bolest má pro organismus pozitivní význam. Chrání tkáně před dalším případným poškozením. Ve většině případů je

lokalizována na určitou oblast těla a považuje se za symptom. V případě neefektivní léčby a přetrvávající příčiny může dojít k rozvoji chronické bolesti, jejíž trvání je delší než 3 až 6 měsíců. Chronická bolest již ztrácí varovný signál a stává se syndromem. Často je doprovázena u pacientů i psychologickými a sociálními změnami jako jsou deprese, úzkosti, sociální izolace atd. (Rokyta, 2009).

Dále můžeme bolest rozlišovat dle vyvolávajících mechanismů na bolest nociceptivní a neuropatickou. Nociceptivní bolest dělíme dle místa stimulace na somatickou a viscerální. Somatická povrchová bolest vzniká při poranění kůže. Hluboká somatická bolest vzniká při poranění kostí, svalů a kloubů, zatímco viscerální bolest vzniká při aktivaci nociceptorů v útrobních orgánech (Cervero a Laird, 1999). Neuropatickou bolest vznikající poškozením nervového systému dělíme dle lokalizace na centrální (při poškození mozku či míchy) či periferní (při poškození nervů) (Kozák, 2013).

Bolest jako komplexní děj má tři složky zpracování: senzoricko-diskriminační, afektivně-motivační, kognitivně-evaluační a jednu efektorovou, motorickou a vegetativní složku. Složka senzoricko-diskriminační informuje o lokalizaci a intenzitě bolesti. Složka afektivně-motivační se podílí na zhodnocení emočního cítění bolesti a třetí složka odpovídá vědomému zhodnocení bolesti. Motorická složka bolesti odpovídá jak za reflexní reakce zprostředkované příčně pruhovanou svalovinou jako je ucuknutí končetiny, tak za komplexní chování a vyhýbání se bolestivým podnětům. Vegetativní složka je zodpovědná za změny srdeční a hladké svaloviny, jako jsou změny tepu, prokrvení nebo teploty apod. (Treede et al., 1999).

2.1 Nocicepce

Nocicepce je dle IASP definována jako neuronální proces kódování škodlivých podnětů, jinými slovy jejich detekce (neboli recepce) a přenos nervovým systémem (neboli transmise). Nocicepce umožňuje předcházet zranění tím, že vyvolává změny chování, ale i změny autonomního charakteru (zvýšení krevního tlaku apod.).

Změnou chování myslíme např. zahájení reflexní obranné reakce, ale i komplexnější nociceptivní odpovědi jako jsou pokusy o únik z prostředí aj. Nocicepce však nemusí být vždy spojena s pocitem bolesti (IASP, 2018). Jakmile se nociceptivní podnět dostane do vyšších etáží CNS, získá kognitivní a emoční složku a dochází k uvědomění si bolestivého stavu. Na druhou stranu je vhodné připomenout, že na úrovni limbického systému může vzniknout bolest s absencí aktivace nocicepce, tj. bez poškození tkání tzv. psychogenní bolest (Rokyta, 2009).

2.2 Senzory bolesti

Při interakci s prostředím je nutné, aby organismus dokázal rozeznat a reagovat na škodlivé podněty. Nociceptivní neurony jsou na vláknech vybaveny specifickými typy receptorů a iontových kanálů, které jim umožňují detekovat podněty různé modality, ale vždy s intenzitou překračující normální fyziologické hodnoty.

Nocicepci a bolest tedy zprostředkovávají receptory senzorického volného nervového zakončení označované jako nociceptory. Definujeme je jako „vysoko-prahové senzorické receptory periferního somatosenzorického nervového systému, které jsou schopny přenášet a kódovat škodlivé podněty“ (IASP, 2018). Pokud intenzita stimulu dosáhne dané škodlivé intenzity (dostatečné amplitudy a trvání), je nociceptor aktivován (Woolf a Ma, 2007). Aktivace nociceptorů je způsobena podněty heterogenní povahy: škodlivým teplem nebo chladem, intenzivním tlakem nebo tahem či chemickými látkami. Jelikož jsou neurony schopné detekovat podněty určité intenzity a kvality, považujeme akutní bolest za smyslovou modalitu (Julius a Basbaum, 2001).

Zajímavé jsou receptory s vysokou prahovou hodnotou, tzv. spící neboli silent nociceptory. Tyto aferentní neurony, objevené u člověka Schmidtem et al. (1995), nereagují za normálních podmínek na mechanické ani na tepelné stimuly. Pokud ale v místě jejich lokalizace probíhá zánětlivá reakce, dojde k jejich „probuzení“ (k jejich aktivaci prostřednictvím zánětlivých mediátorů) a k reakci

na mechanickou a termickou noxu. Navíc vykazují schopnost senzitivace a mohou tak přispět ke vzniku hyperalgie (viz kapitola 3.1) (Michaelis et al., 1996).

2.3 Vedení informace primárním nociceptorem

Těla primárních senzitivních neuronů jsou uložena v dorsálních spinálních gangliích (DRG). Rychlost přenosu koreluje s průměrem axonů a s jejich myelinizací. Nervová vlákna rozlišujeme dle myelinizace a rychlosti vedení na $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$, $A\delta$, B a C vlákna. Za nociceptivní přenos odpovídají především vlákna $A\delta$ a vlákna typu C, případně i vlákna typu $A\beta$.

Senzorické neurony se středně velkými těly s vlákny typu $A\delta$ (průměr 2-6 μm , rychlost $\sim 12\text{-}30 \text{ m.s}^{-1}$) odpovídají za rychlý přenos nociceptivní informace. Druhým typem senzorických vláken vedoucích bolest, jsou vlákna typu C, jejichž neurony mají tělo a axon nejmenšího průměru. Tenká C vlákna se od již zmíněných liší tím, že nejsou myelinizovaná a vedou nejpomaleji ze všech typů nervových vláken (průměr 0,4 až 1,2 μm , rychlost $\sim 0,5$ až 2 m.s^{-1}) (Djouhri a Lawson, 2004).

V závislosti na vedení různými typy vláken rozlišujeme bolest na rychlou a bolest pomalou. Vlákna $A\delta$ jsou odpovědná za dobře lokalizovanou, rychlou bolest, některými autory označovanou jako bolest 1. linie. Vlákna C naopak vedou pomalou tupou bolest (také i viscerální a zánětlivou), která je špatně lokalizovaná a označuje se jako bolest 2. linie.

Rychle vedoucí silně myelinizovaná vlákna $A\beta$ za normálních fyziologických podmínek informace o bolesti nevedou. Jejich primární funkcí je vést informaci o mechanických stimulech, až po silné stimulaci překračující prahovou hodnotu nebo po své senzitivaci se zapojují do vedení bolestivé informace (Basbaum et al., 2009).

2.4 Dráhy nocicepce a bolesti

Informace je prostřednictvím výše popsaných vláken vedena do zadních míšních rohů, kde dochází k prvnímu zpracování nociceptivní informace (v případě informací pocházejících z hlavy do Varolova mostu mozkového kmene u neuronu trigeminálního ganglia, jehož dráha dále sestupuje spinálním trigeminálním traktem do trigeminálního komplexu). Povrchová akutní bolest je vedena především do Rexedovy zóny I, II (substantia gelatinosa Ronaldi) a III, zatímco zóny V, VII, VIII, X jsou cílem pro vlákna vedoucí informaci o viscerální, hluboké bolesti (Rokyta, 2012).

Na míšní úrovni je nociceptivní podnět převeden také na motorické neurony laminy IX, které jsou v předních rozích míšních a jejichž vlákna vycházející předními míšními kořeny zprostředkovávají obranný reflex. Jak bylo uvedeno výše, druhý neuron dráhy bolesti však leží v laminách II, III a V, jeho vlákna kříží střední linii a pokračují kolaterálně ascendentním směrem. Informace je vedena prostřednictvím spinothalamického traktu do thalamu, kde končí na ventroposterolaterálním jádru. Tento typ dráhy označujeme jako neospinotalamický. Pokud je informace vedena z hlavové části trigeminálním nervem z mozkového kmene, končí na ventroposteromediálním jádru. Z talamických jader je dále informace vedena do senzorické oblasti kůry S1 a S2 (viz obr. 1), kde dochází k vyhodnocení intenzity bolesti a její lokalizace. Informace je také vedena do kůry insulární a cingulární, kde je zpracována afektivně motivační složka bolesti. Druhým typem je paleospinotalamický trakt, kterým je vedena hlavně pomalá bolest. Paleospinotalamický trakt vede do retikulární formace a poté projikuje do thalamu, kde končí na nespecifických jádrech, odkud vede projekce do přední cingulární kůry a insuly. Za afektivně emoční složku bolesti odpovídá také tractus spinoparabrachialis. Přepojuje se z míchy do parabrachiálních jader a končí buďto v hypotalamu, nebo v amygdale. Samotný vjem bolesti vzniká zřejmě na úrovni mozkové kůry, ale pravděpodobně může vzniknout také již na úrovni thalamu (Rokyta, 2012; Bourne et al., 2014).

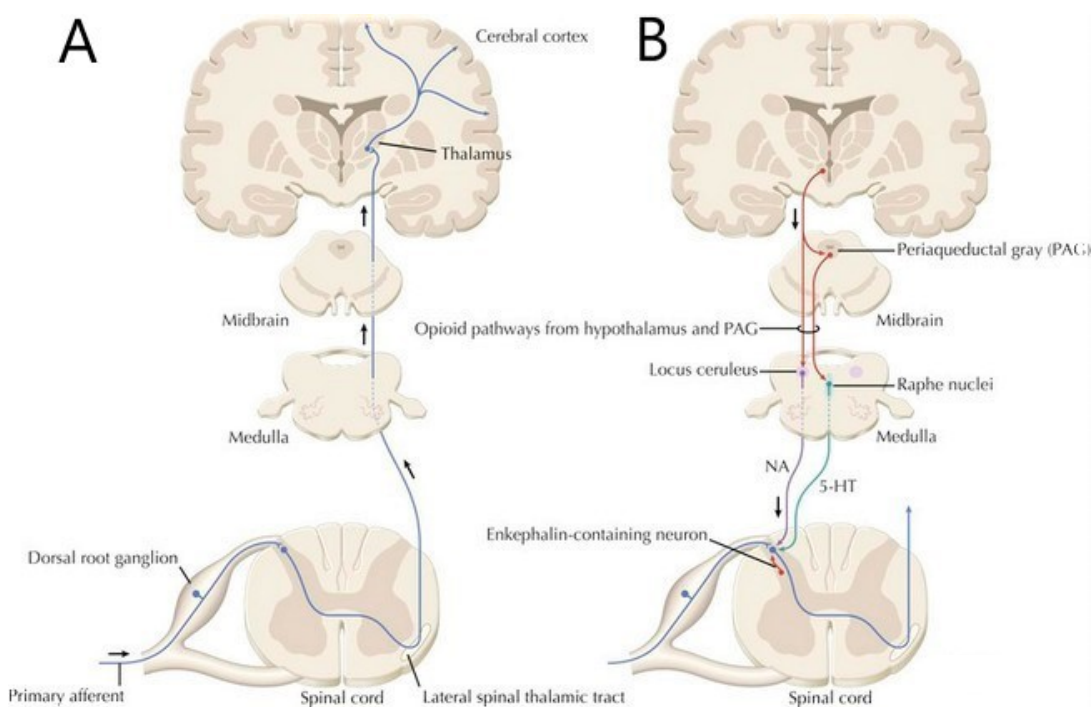
2.4.1 Antinociceptivní systém

I přesto, že vnímáme bolet spíše jako nepříjemnou a negativní zkušenost, má nociceptivní bolest pro organismus protektivní význam, dokáže nás varovat a chránit před případným či dalším poškozením tkáně. Avšak v určitých situacích je pro organismus výhodné bolest utlumit.

K tomuto tématu přispěli Melzack s Wallem (1967) s vrátkovou teorií, která vysvětluje princip zmírnění bolesti např. hlazením či olizováním bolestivého místa. Princip spočívá v transmisivní (T) buňce (nacházející se v zadních rozích míšních) a vedení nociceptivní informace dvojí cestou. Transmisivní buňka vede informaci o mechanoreceptci prostřednictvím A β vláken, jakmile dojde k bolestivé stimulaci, tato buňka se „přepne“ a začne vést bolestivé vzruchy. Tento systém funguje i v opačném směru. Jakmile jsou mechanoreceptory silně stimulovány, T buňka se opět „přepne“ a potlačí tak informaci o bolesti.

Složitější způsob endogenního tlumení bolesti – descendentní antinociceptivní systém (viz obr. 1) – se zapojuje například v momentě, kdy je organismus ve stresu. Hlavním centrem endogenního antinocicepčního systému je periaquedukální šed' mezencefala (PAG). Jádra amygdaly, prefrontálního kortexu a hypotalamu vedou vlákna do PAG, odkud neurony projikují do rafeálních jader a do locus coeruleus v mozkovém kmeni. Dále prostřednictvím serotonergních a noradrenergických drah je informace vedena na interneurony v substantia gelatinosa. Tyto serotonergní a noradrenergické dráhy jsou za normálních fyziologických podmínek (při nebolestivém stavu) inhibovány GABAergními interneurony. Po navázání opioidů (ať už endogenních či exogenních) na opioidní receptory dojde k utlumení inhibiční signalizace a sestupné dráhy jsou aktivovány (Yamamotová a Papežová, 2010).

V substantia gelatinosa opioidy podmiňují presynaptickou inhibici blokadí vápenatých kanálů a tím i substance P, která zprostředkovává nociceptivní transmissi mezi prvním a druhým neuronem. Také může docházet k inhibici postsynaptické, k vyplavení inhibičních mediátorů, které se naváží na receptory postsynaptické membrány sekundárního neuronu a sníží tím pravděpodobnost jeho depolarizace a dalšího přenosu informace (Millan, 2002).



Obrázek 1 – Ascendentní a descendentní dráhy bolesti.

A – Primární aferentní neurony s buněčnými těly v DRG se přepojují na sekundární neurony v zadním rohu míšním a vedou do kolaterální oblasti míchy. Spinothalamickým traktem je informace vedena do thalamu. Z thalamu vede projekce do somatosenzorické kůry a limbických oblastí mozku.

B – Descendentní dráhy bolesti vedou z vyšších mozkových struktur do PAG středního mozku. Odtud vede noradrenergní a serotonergní projekce k synapsím ascendentní dráhy zadního míšního rohu, kde modulují přenos nociceptivního signálu. Převzato z Markman (2015).

3. Neuropatická bolest

Neuropatická bolest je definována dle IASP (2018) jako „bolest způsobená lézí nebo dysfunkcí somatosenzorického nervového systému“. Na rozdíl od protektivní a snadno potlačitelné nociceptivní bolesti, neuropatická bolest zhoršuje životní úroveň, nemá pro organismus již žádný přínos a je špatně léčitelná (Rokyta, 2009).

Etiologie neuropatické bolesti je složitá a multifaktoriální. Rozlišujeme několik druhů dle počtu poraněných nervů:

- mononeuropatie – vzniká při poškození jednoho nervu,
- multiplexní mononeuropatie – vzniká při poškození více nervů,
- polyneuropatie – vzniká, pokud je poškození nervů difúzní a bilaterální (IASP, 2018).

Dle etiologie rozlišujeme různé typy neuropatické bolesti jako je postherpetická, diabetická, posttraumatická, pooperační neuropatie, bolest spojená s infekcí HIV či komplexní regionální bolestivý syndrom II. typu – bolestivé stavy, které jsou charakterizovány přítomností chronické, intenzivní bolesti často v jedné končetině s tendencí se zhoršovat (Colloca et al., 2017).

Neuropatická bolest se vyskytuje buď jako perzistující, nezávislá na stimulaci (spontánní) a může se objevovat jak kontinuálně tak i v přerušovaných epizodách, nebo jako evokovaná, na stimulech závislá bolest. Neuropatická bolest se může šířit i mimo místo svého poranění tzv. sekundární hyperalgezie (Latremoliere a Woolf, 2009).

3.1 Buněčné aspekty

Traumatické poškození a následný rozvoj neuropatické bolesti je zapříčiněn prvotně změnami v buněčné signalizaci. Dochází ke změnám elektrických vlastností senzorických vláken a k dysregulaci rovnováhy mezi excitační a inhibiční signalizací. Na periferii, v míše i vyšších etážích CNS dochází k zeslabení inhibice

descendentních drah antinociceptivního systému, ale i k posílení excitability ascendentní dráhy bolesti.

Periferní a centrální senzitivace způsobená **hyperexcitabilitou** nociceptivního systému vede k poklesu prahu bolesti a tím ke zvýšené odpovědi nociceptorů. V důsledku může docházet k detekci signálů, které nejsou za běžných fyziologických podmínek vnímány jako škodlivé (**alodynie**). Nociceptory mohou při senzitivaci přehnaně reagovat i na podněty škodlivé a vytvářet tak dlouhodobější signalizaci (**hyperalgezie**) (Colloca et al., 2017).

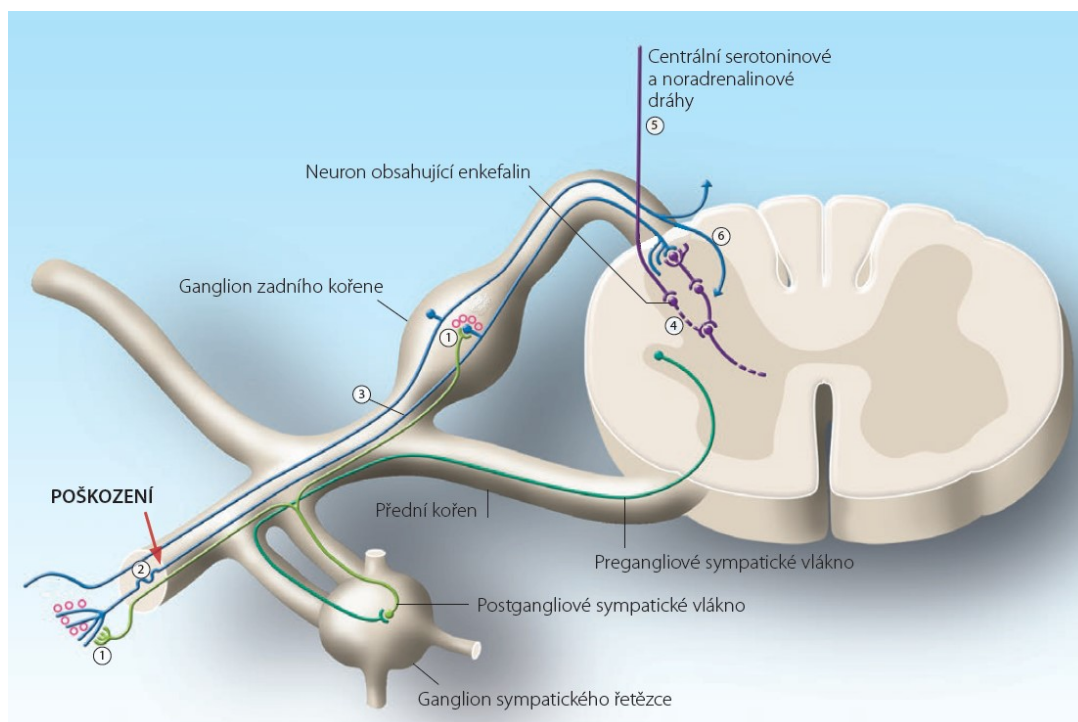
Periferní senzitivace je omezena na místo poraněné tkáně, které je vystaveno zánětlivým mediátorům. Na rozvoji zánětlivé reakce se v místě poranění podílí substance P způsobující degranulaci žírných buněk a vyplavení histaminu. Vazodilatace způsobená histaminem umožní migraci makrofágů, T lymfocytů, vtok cytokinů aj. Na senzitivaci se též podílí zvýšená akumulace napěťově ovládaných Na^+ kanálů vedoucí ke snížení prahu receptorů a k potenciaci rozvoje spontánní bolesti. Na^+ kanály se tedy uplatňují v nastavení prahu nociceptorů (Zieglgänsberger et al., 2005). Blokátory Na^+ kanálu se tudíž mohou používat u pacientů s neuropatickou bolestí kvůli svému analgetickému efektu. Nespecifické blokátory jako je např. lidokain často vyvolávají nežádoucí vedlejší účinky. Při použití selektivních blokátorů periferních Na^+ kanálů (zejména Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9) lze alespoň částečně vedlejší účinky eliminovat. Podtypy napěťově řízených Na^+ kanálů byly asociovány s určitými typy bolesti. Např. u akutní mechanické bolesti je zapojen podtyp Nav1.7, zatímco blokací podtypu Nav1.8 můžeme zmírnit viscerální bolest. Kanál Nav1.9 hraje roli v zánětlivé bolesti a je potencionálním cílem pro její farmakoterapii (Liu a Wood, 2011).

Dále dochází k sekundárním změnám, zvětšení percepčních polí a ke zvýšené aktivitě neuronů zadních míšních rohů a k rozvoji **centrální senzibilizace**. Na míšní úrovni probíhá sumace signálů přicházejících z periferie. Tyto sice původně podprahové akční potenciály při časové sumaci vedou k výlevu excitačních aminokyselin a neuropeptidů a tím vyvolávají přetrvávající depolarizaci v zadních

rozích míšních (Kozák, 2010). Při opakování stejného stimulu je odpověď zesílena zvýšenou aktivitou glutamátových NMDA a AMPA receptorů (tzv. wind up fenomén). Dochází ke zvýšenému přenosu bolestivých podnětů do vyšších etáží centrálního nervového systému oproti míře aferentních vstupů do zadních míšních rohů (Woolf a Thompson 1991). AMPA receptory mají zvýšenou vodivost díky fosforylaci, která reguluje i jejich inkorporaci do plazmatické membrány neuronu. Kontinuální uvolňování glutamátu tak přispívá ke vzniku hyperalgie (Ferreira a Lorenzetti, 1994; Latremoliere a Woolf, 2009).

Informace v případě poškození axonů nemusí být přenášena pouze na synapsi, ale může být předávána i z jedné membrány nervového vlákna na membránu sousedícího nervového vlákna. Tento jev označujeme jako tzv. cross-talk nebo eapse, vedoucí ke spontánní ektopické aktivitě (Kozák, 2010). Vyruchová aktivita je tím abnormálně zesílena (Rokyta, 2009). V důsledku poranění může také docházet k pučení výběžků nervových vláken A β (sprouting) a jejich prorůstání do dalších míšních lamin (viz obr. 2).

K centrální senzitivizaci navíc přispívají i gliové buňky především astrocyty a mikroglie, které potencují infiltraci imunitně kompetentních buněk, které uvolňují zánětlivé mediátory a potencují a senzitivizují nociceptory (Latremoliere a Woolf, 2009).



Obrázek 2 – Znázornění lokalizace molekulárních změn vyvolávacích neuropatickou bolest. 1 – prorůstání vláken na primárních aferentních zakončeních a tělech primárních sensorických buněk, 2 – snížený práh pro vnímání nociceptivních signálu, 3 – efapse, 4 – zvýšená signalizace glutamátu způsobující odumírání inhibičních neuronů, 5 – nedostatečná signalizace sestupnými inhibičními drahami, 6 – omezení vrátkování v substantia gelatinosa. Převzato a upraveno podle Felten et al., 2012, cit. podle Hakl a Neudertová, 2015.

3.2 Psychologické aspekty

Chronická bolest je u 20-40% pacientů doprovázena psychologickými poruchami. Pacienti s chronickou bolestí často trpí na přidružené komorbidity jako je insomnie, anhedonie, deprese a úzkostné stavy, které ovlivňují vnímání intenzity bolesti (Torta et al., 2017). Tyto komorbidity negativně ovlivňují terapii neuropatické bolesti (Argoff, 2007). I přesto, že neuropatická bolest snižuje kvalitu života u lidí (špatná nálada, poruchy fyzického, sociálního fungování a kognitivních funkcí), bylo provedeno pouze málo studií zabývajících se těmito aspekty u zvířat (Haythornthwaite a Benrud-Larson, 2000). Po poranění periferního nervu a vzniku

neuroimunitního poškození dochází prostřednictvím signálních drah k rozvoji supraspinálního neurozánětu, ke změnám v CNS a k vzniku přidružených komorbidit (Fiore a Austin, 2016). Za regulaci afektivního chování odpovídá především hipokampus, mediální prefrontální kortex, ventrální tegmentální oblast (VTA) a amygdala. V těchto oblastech mozku byla prokázána zvýšená aktivace gliových buněk a exprese prozánětlivých cytokinů při periferní neuropatii (Drevets et al., 2008; Benatti et al., 2016).

Neuropatická bolest je jedním z nejobtížněji léčitelných bolestivých syndromů. Výběr léčiva je komplikovaný obtížným určením přesného mechanismu rozvoje neuropatické bolesti u daného pacienta. Strategie léčby pro zlepšení kvality života pacienta může být založena jak na farmakologické tak i na nefarmakologické terapii. Při léčbě neuropatické bolesti by měl lékař posuzovat jak samotnou bolest tak právě i přidružené komorbidity bolesti. Bylo totiž ukázáno, že účinná léčba komorbidit zlepšuje výsledky léčby bolesti (Nicholson a Verma, 2004).

4. Modely neuropatické bolesti

Animální modely slouží jako nástroj pro pochopení mechanismů nociceptivní a neuropatické bolesti a k vývoji účinné terapie. Farmakoterapie chronické bolesti není stále dostačující. Proto je stále potřeba vyvíjet nová analgetika a terapeutické strategie pro tlumení bolesti. Vývoj nových či účinnějších léčiv je založen především na pokusech na zvířecích modelech, ve kterých jsou nejčastěji používanými druhy potkani a myši (Gregory et al., 2013; Burma et al. 2017). Přestože je studiu bolesti věnováno velké úsilí, translace výsledků výzkumu do klinické praxe je minimální. Jedním z důvodů může být nevhodné používání metod testujících bolest či nekorespondující animální modely. Při používání animálních modelů musíme správně hodnotit bolestivé chování zvířat, které by mělo odpovídat bolesti u lidských pacientů (Deuis et al., 2017). Ideální model

neuropatické bolesti by měl vyvolávat po delší dobu spontánní i evokovanou složku bolesti jako je alodynzie a hyperalgezie (Jaggi et al., 2011).

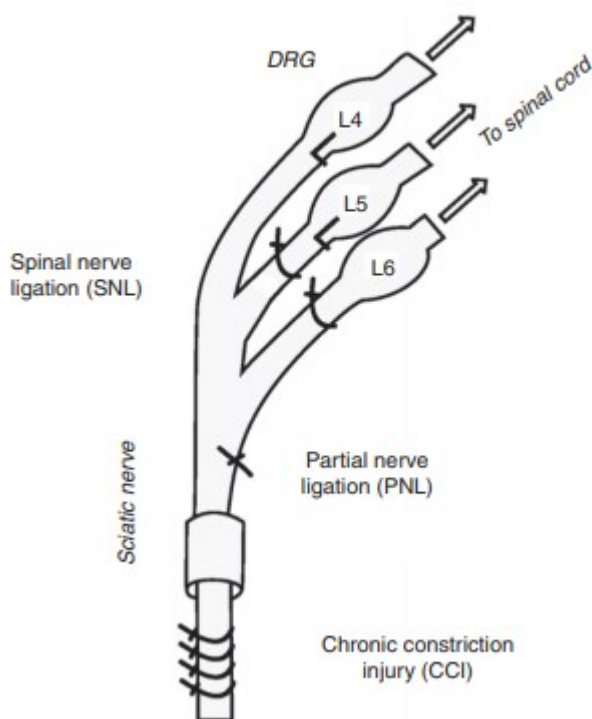
Bylo vyvinuto mnoho experimentálních metod vyvolávající různé typy neuropatické bolesti, které modelují lidské bolestivé stavy. Modely periferní neuropatické bolesti jsou většinou založeny na manipulaci se sedacím nervem, buď jde o jeho kompletní transekcii (Wall et al., 1979) nebo o ligaci spinálních (Ho Kim a Mo Chung, 1992) či periferních nervů (viz obr. 3). Periferní nerv je buď podvázán volně a čtyřnásobně (chronická konstriktce ischiadického nervu – CCI) podle Bennetta a Xieho (1988) nebo je pevně podvázána 1/3 až 1/2 nervu (Seltzer et al., 1990).

4.1 Chronická konstriktce ischiadického nervu

CCI modeluje unilaterální periferní mononeuropatii a koreluje s regionálním bolestivým syndromem II. typu u pacientů. CCI spočívá v expozici ischiadického nervu a volného založení čtyř ligatur kolem nervu ve vzdálenosti 1 mm. Uložení ligatur kolem nervu je spojeno s rozvojem intraneurálního edému a degenerací některých nervových vláken. Po konstriktci nervu dochází k poklesu rychlosti nervového vedení a k většímu poškození myelinizovaných A δ vláken oproti nemyelinizovaným C vláknům (Carlton et al, 1991). Po operaci se rozvíjí evokovaná neuropatická bolest, která po několika dnech dosahuje svého vrcholu. Sedmý den po CCI dochází k signifikantnímu rozvoji evokované neuropatické bolesti a zhruba po 14 dnech začíná bolest pomalu odeznívat (Panušková, 2019), bolest přetrvává ale až 2 měsíce po operaci. Podle původní studie Bennetta a Xieho (1988) dochází i k rozvoji spontánní bolesti, jejímiž projevy jsou automutilace, kulhání a vyhýbaní se postavení na ipsilaterální končetinu aj. Přítomnost spontánní bolesti je ale některými autory zpochybňována (Dalm et al., 2015).

Úzkosti a deprese jsou častou komorbiditou u pacientů trpících neuropatickou bolestí (viz výše). U animálního modelu CCI bylo prostřednictvím testu vyvýšeného bludiště potvrzené chování podobné úzkosti (Roeska et al., 2008). Chování podobné depresi bylo prokázáno u potkanů po CCI testem nuceného plavání a následně potlačeno antinociceptivní léčbou (Hu et al., 2009).

Nevýhodou modelu CCI jsou variabilní výsledky způsobené odlišností napětí ligatur kolem sedacího nervu a variabilitou počtu a typu poškozených vláken. Další rozdílnost může vzniknout při použití odlišného druhu použitého materiálu při ligaci (Jaggi et al., 2011).



Obrázek 3 – Schéma základních experimentálních modelů periferní neuropatické bolesti. Znázornění ligace spinálních nervů L5 a L6 (SNL), částečné ligace (PNL) a chronické konstriktce ischiadického nervu čtyřmi ligaturami (CCI). Převzato a upraveno podle Stemkowski et al., 2013.

5. Měření bolesti

Povaha bolesti nám neumožňuje její objektivní měření, které je u zvířat ještě komplikovanější tím, že nám nemohou pocit bolesti verbálně sdělit. Bolest u zvířat tedy nelze přímo měřit žádným testem. Nepříjemný bolestivý zážitek pouze odvozujeme od chování podobnému bolesti (Deuis et al., 2017). V současné době se používá několik druhů nepřímých testovacích metod, prostřednictvím kterých u zvířat měříme bolesti podobné chování projevující se např. odtažením končetiny od bolestivého stimulu, zvýšenou péčí o postižené místo, vokalizací, sníženou pohyblivostí aj. Behaviorální testy dělíme na základě použití externího stimulu na testy evokované bolesti a na testy spontánní bolesti na stimulech nezávislé.

Metody s použitím externího stimulu byly vyvinuty jako první a dodnes jsou hojně využívány. V návaznosti na tyto testy byly zavedeny i testy nereflexní vyžadující supraspinální, korové zpracování. Při kvantifikování bolesti záleží na typu použitého modelu bolesti a na otázce, kterou si výzkumník pokládá. Pro pochopení kortikálních mechanismů a vědomě vnímané bolesti jsou využívány nereflexní metody, zatím co při studiu periferních mechanismů mohou být nápomocné i testy reflexní.

Bylo prokázáno, že hlodavci potlačují chování specifické pro bolest v přítomnosti pozorovatele. Nepřímo prováděné metody, bez přítomnosti člověka, se proto zdají být vhodnější volbou (Mogil, 2009).

5.1 Testy evokované bolesti

Evokovanou bolest lze měřit reflexními a operantními metodami. Reflexní testy jsou založeny na měření prahu bolesti, který definujeme jako minimální intenzitu stimulu, která je vnímána jako bolestivá (IASP, 2018). Prostřednictvím nociceptivních reflexních testů lze hodnotit behaviorální reakce na mechanické, tepelné, chladové a případně i chemické a elektrické stimuly. Principem reflexních testů je zvyšování intenzity stimulu do vyvolání bolestivé odpovědi. Při testování

měříme dobu či intenzitu potřebnou k zahájení obranné únikové reakce. Obrannou reakcí je nejčastěji motorický reflex odtažení končetiny či komplexnější odpověď zvířete (péče o končetinu, pokusy o únik z prostředí aj.).

Výhodou reflexních testů je rychlost prováděného testování a možnost opakovatelnosti testů. Další výhoda spočívá v možnosti volby konkrétního místa aplikace stimulu. U reflexních testů se stimul aplikuje buď na tlapku, nebo na ocas zvířete. Například při testování na unilaterálním modelu bolesti, může experimentátor měřit jak postiženou tak i intaktní končetinu. Změny v signalizaci nociceptivních neuronů u chronické bolesti vedou ke snížení prahu bolesti a k rozvoji hypersenzitivity. Měřením reflexních obranných reakcí vyhodnocujeme spíše onu hypersenzitivitu než-li samotnou komplexní bolest (Gregory et al., 2013). Proto bolest měřená reflexními testy nekoreluje s klinickou bolestí, která zahrnuje kognitivní i emocionální zpracování (Mogil, 2009). Navíc většina reflexních testovacích metod během testování vyžaduje manipulaci se zvířetem a výsledky mohou být ovlivněny stresovou analgezií (Turner et al., 2019). Také hodnoty z behaviorálních měření jsou často subjektivní a ovlivněné pohledem experimentátora. Při hodnocení naměřeného výsledku, musí experimentátor rozlišit, zda odtažení končetiny bylo nociceptivní odpovědí či zvíře pouze zahájilo pohyb, čištění atd. (Deuis et al., 2017).

Prostřednictvím reflexních nociceptivních testů se často hodnotí účinnost analgetik. Jejich použití je možné i u lidských pacientů, u kterých se např. na měření mechanické alodynies často používá test von Freyovými vlákny (Tena et al., 2012).

K hodnocení motivace zvířete vyhledávat úlevu od bolesti a k posouzení účinnosti léčby, se využívají vedle reflexních také operantní preferenční metody. Na rozdíl od reflexivních metod vyžadují preferenční testy zapojení všech úrovní zpracování a složek bolesti. Principem preferenční metody je sledování emoční složky bolesti zvířat při jejich rozhodování mezi dvěma podněty. Následně vyhodnocujeme averzi či preferenci zvířete k danému podnětu. Operantní testy přispívají k nahlédnutí zpracování bolestivého vjemu nad rámec vrozených

reflexivních odpovědí. Ale na rozdíl od reflexních testů vyžadují několikadenní trénink zvířete (Burma et al., 2017).

5.1.1 Měření bolesti evokované tepelnou stimulací

Při tepelných testech prahu bolesti aplikujeme paprsek buď na ocas či končetinu zvířete. Pro měření latence švihnutí ocasem po aplikaci tepelného stimulu lze použít tail flick test (D'Amour a Smith, 1941). Nevýhodou testu je fixace zvířete v testovací komoře, čímž je zvíře vystaveno stresu. Dalším typem tepelného testu je hot plate test. Zvíře se umístí na kovovou desku (Woolfe a Macdonald, 1944), která je buďto předeřtá na konstantní teplotu či se postupně ohřívá. Experimentátor měří čas potřebný k zahájení chování podobného bolesti, jako jsou pokusy o únik z prostředí, olizování končetin, vokalizaci aj. Pro studium tepelného prahu bolesti se nejčastěji používá Hargreavesův plantar test.

5.1.1.1 Hargreavesův plantar test

V plantar testu (Hargreaves et al., 1988) je zvíře umístěno v plastovém boxu, ve kterém má umožněný volný pohyb, čímž se snižuje pravděpodobnost ovlivnění výsledků stresovou analgezií. Pro minimalizaci pohyblivosti zvířete v boxu je potřeba habituace, která u potkanů trvá pouze pár minut. Zdroj tepla se umístí pod testované zvíře, namíří se přes skleněné dno na plantární povrch končetiny a současně s rozsvícením tepelného paprsku se spustí časovač. Čas, po kterém zvíře zahájí únikový obranný reflex, případně i jiné behaviorální projevy jako olizování končetiny aj., se zaznamená jako doba latence obranného reflexu, která se většinou označuje jako tepelný práh bolesti. Nastavení intenzity aparatury by mělo být takové, aby se normální latence pohybovala kolem 10 až 12 sekund. V případě nastavení příliš vysoké intenzity vyvolávající velmi krátké latence (<3 s), se data špatně vyhodnocují, latence únikové reakce se nemusí mezi tlapkami lišit a zaniká tak rozdíl mezi kontrolní a postiženou končetinou. Intenzita vyvolávající delší latence odpovědi, může vést ke spontánnímu pohybu zvířete bez obranného reflexu. U zvířat pod vlivem silnějších analgetik nemusí dojít k odtažení končetiny.

Pro zabránění poranění tkáně zvířete je proto potřeba nastavit cut-off hladinu stimulace (většinou 22 s).

Hargreavesův plantar test je vhodnou metodou pro testování modelů unilaterálních neuropatií. Můžeme měřit ipsilaterální i kontralaterální končetinu zvlášť a zvíře se tak stává svou vnitřní kontrolou. Při bolestivém stavu se práh bolesti na ipsilaterální končetině snižuje. Po podání analgetik dochází k prodloužení latence, a proto je vhodným testem při zjišťování míry působení analgetik.

5.1.1.2 Metoda podmíněné teplotní preference (TPP)

Jedním z testů zkoumající afektivně-emoční složku bolesti je operantní metoda TPP (Mauderli et al., 2000). TPP testuje preferenci zvířat k dvěma sousedním plotnám. Plotny jsou nastavené na různé teplotní stupně. Jedna plotna je zahřívána, zatímco druhá je ochlazována na zvolenou teplotu. Zvířata mají umožněný volný pohyb, čímž se zmírňuje stres zvířete. Zkušenostmi (pokusem – omylem) se učí, že mohou uniknout z jedné desky na druhou. Zvíře si tedy samo může vybrat komfortnější teplotní zónu. Tato jejich komplexní reakce vyžaduje zpracování ve vyšších nervových etážích. Přístroj sám vyhodnocuje, na které plotně se zvíře zdrželo déle (Vierck et al., 2002).

Teploty se nastavují tak, aby u kontrolních zvířat docházelo k přibližné 50% obsazenosti každé plotny, tedy aby míra averze byla u ploten stejná. Neuropatická bolest způsobuje změny ve vnímání tepelných nociceptivních stimulů, které můžeme porovnávat s kontrolní skupinou. Následně po aplikaci léčiv sledujeme změny v teplotní preferenci mezi teplou a studenou deskou.

Nevýhoda spočívá v nemožnosti použití léčiv se sedativním nebo myorelaxačním efektem, které mohou snižovat motorickou aktivitu a přechody zvířete mezi deskami. Další nevýhodou u unilaterálních modelů je, že vjem z jedné končetiny nemusí být dostatečně silný anebo si zvíře může ulevit od bolesti zvednutím končetiny (Caporoso et al., 2020).

5.1.1 Měření bolesti evokované mechanickou stimulací

Nejčastěji používaným testem pro měření mechanické alodynie je test vonFreyovými vlákny. Zvíře je umístěno do testovací aparatury se síťovaným dnem, skrz které se vlákno kolmo aplikuje

Původní manuální testování je založeno na aplikaci nylonových vláken v sadě o 20 vláken s různými hmotnostmi od 0,008 g do 300 g. Testování probíhá od nejmenšího vlákna do tzv. prahového vlákna vyvolávajícího nociceptivní chování (Barrot, 2012).

Inovativní elektronické vonFrey testy jsou založeny na aplikaci pouze jednoho filamentu se zabudovaným siloměrem. V momentě, kdy zvíře odtáhne končetinu, přístroj automaticky zaznamená hodnotu prahové síly v gramech. Výhoda spočívá v kontinuální aplikaci jednoho vlákna, získání přesného výsledku (kontinuální škála) a zkrácení testovacího času (Deuis et al., 2017).

Nevýhody testu von Freyovými vlákny spočívají v možných variabilních výsledcích v závislosti na místě a sklonu aplikace vlákna, testovaná zvířata také mohou při opakovaném měření odtahovat končetiny dříve jako ochranu před bolestivou stimulací (Mogil, 2009).

5.2 Testy spontánní bolesti

Spontánní bolest může být nepřetržitá, ale i paroxysmální, náhle nastupující silná bolest, popisována pacienty jako bodavá, vystřelující či pálivá bolest (Jensen et al., 2001). V klinické praxi se využívají dotazníky, kde pacient zaznamenává intenzitu bolesti dle škály od 0 do 10 (Deuis et al., 2017) nebo jiné dotazníky hodnotící každodenní činnosti. U zvířat je ale spontánní bolest velmi obtížně měřitelná a nemáme dostatek hodnotících technik. U periferní neuropatie lze spontánní bolest hodnotit z pohybů a péče o ipsilaterální končetinu, což může odpovídat pozorováním u lidí. Pacienti s chronickou bolestí mají totiž nižší úroveň fyzické aktivity a postižené končetině věnují větší pozornost

(Tappe-Theodor a Kuner, 2014). Spontánní bolestivost u zvířat můžeme vyhodnocovat podle nečinnosti, sociální interakce a péče zvířete (Gregory et al., 2013).

Jednou z používaných metod je myší škála grimas, což je systém rozpoznávání bolestivých stavů založený na výrazech obličeje. Lze použít pro hodnocení bolesti u myší i potkanů (Burma et al., 2017). Dále se pro hodnocení spontánní bolesti využívá sledování rozkládání váhy zvířete, analýza jeho chůze či jeho pohybová aktivita apod. Další zavedenou metodou pro testování spontánní bolesti je metoda podmíněné preference místa (Deuis et al., 2017).

5.2.1 Metoda podmíněné preference místa (CPP)

U metody CPP se klasickým podmiňováním snažíme vytvořit asociaci testovanému zvířeti mezi specifickým místem a úlevou od bolesti. Konkrétní místo představuje podmíněný podnět, zatím co úleva od bolesti podnět nepodmíněný. Měřicí zařízení se skládá ze tří komor. Dvě komory slouží pro podmiňování zvířete a jsou od sebe vizuálně a taktilně odlišeny. Třetí prostřední malá komora je neutrální a odděluje dvě postranní podmiňovací komory. Při testování analgetik je naším cílem asociovat zvířeti analgetikum a tedy úlevu od bolesti s příslušnou komorou. Následně pokud má zvíře na výběr, mělo by v případě účinného analgetika a spontánní bolesti preferovat komoru, se kterou bylo analgetikum asociováno (King et al., 2009).

Výhodou CPP je, že finální testování probíhá bez aplikace léčiva, nedochází tedy k případnému ovlivnění motoriky zvířete, která by mohla ovlivnit výsledky. Oproti tomu nevýhodou CPP je, že nelze využít při testování účinků látek, které mají vliv na paměť a učení nebo jsou samy o sobě atraktanty (Huston et al., 2013).

6. Methylfenidát

U některých pacientů trpících chronickými bolestivými stavy je léčba tradičně používanými analgetiky nedostačující a provázena nežádoucími vedlejšími účinky. K úlevě od chronické bolesti se často používají opiody, které však mají vedlejší účinky (poruchy kognice, sedace aj.). Proto je výhodné je kombinovat s psychostimulancii. Terapie psychostimulancii může potenciovat léčbu opiodními analgetiky a snižovat jejich vedlejší účinky (jako je zlepšení kognitivních funkcí či snížení sedativního efektu vyvolaného opiody). Opioidy a některá stimulantia jako je např. methylfenidát účinkují ve stejných strukturách mozku a oba ovlivňují dopaminergní signalizaci. Opioidy uvolňují dopamin ve VTA projikujícím do nc. accumbens a limbických podkorových struktur (Altier a Stewart, 1999). Dopamin je opiody uvolňován nepřímo inhibicí GABAergní signalizace. Methylfenidát zvyšuje koncentraci dopaminu přímo blokací dopaminového transportéru (DAT) (Yamamoto et al., 2016). Společný molekulární mechanismus analgezie a odměny (zvýšená dopaminergní signalizace v mezolimbické dráze odměny) potlačuje emoční reakce na škodlivé stimuly (Wenthur, 2016). Mechanismus působení methylfenidátu spočívá jak v blokaci DAT, tak i v blokaci (noradrenalinového transportéru (NET)). Blokuje zpětné vychytávání dopaminu a noradrenalinu do presynaptického zakončení neuronu a zvyšuje tak jejich koncentraci v synaptickém prostoru. Methylfenidát je mírným stimulantem CNS a centrálně působícím sympatomimetikem zvyšujícím bdělost a zlepšujícím pozornost.

V klinické praxi se methylfenidát využívá k potlačení některých příznaků ADHD především u dětí a dospívajících, u narkolepsie a u bipolární poruchy (SÚKL, 2010; Adida a Azorin, 2014). Porucha ADHD má nejasnou etiologii. Léčba zahrnuje jak farmakoterapii methylfenidátem tak i psychologickou léčbu. Cílem je stabilizace dítěte utlumením jeho impulzivity, hyperaktivity, tékavosti a udržení jeho pozornosti. Mechanismus účinku methylfenidátu u ADHD není zcela objasněn (SÚKL, 2010). Zvýšená dopaminergní signalizace v bazálních gangliích, způsobená efektem methylfenidátu, zlepšuje reakce pro daný úkol a zvyšuje tak jeho

významnost. Zvýšená koncentrace dopaminu má také protektivní vliv na konektivitu mozku. Předpokládá se, že tyto účinky přispívají k zlepšení rozlišení signálu od okolního hluku a metylfenidát tak zlepšuje pozornost na daný úkol (Volkow et al., 2002).

Ve studii Treistera et al. (2013) byla zjištěna interakce mezi vnímáním bolesti a podáváním methylfenidátu u dospělých s poruchou ADHD. Po aplikaci methylfenidátu se významně zvýšil práh bolesti na chladové stimuly. Navazující studie testovala, zda má methylfenidát antinociceptivní efekt či obecně zeslabuje účinky na různé averzní senzorycké modalit u lidí. Averze na sluchové podněty se po aplikaci methylfenidátu nezměnila, zatímco práh bolesti na chladové stimuly se po podání methylfenidátu zvýšil. Methylfenidát měl tedy signifikantní antinociceptivní efekt (Pud et al., 2017). Antinocicepční účinek methylfenidátu byl také testován v kombinaci s morfinem. Ve studii Yamamotové et al. (2016) bylo prokázáno, že methylfenidát v dávce 1 mg/kg zlepšuje analgetické vlastnosti morfinu při podání kombinace obou látek, snižuje sedativní účinky morfinu a zlepšuje náladu pacientů.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. Cíle práce

Prvním cílem práce bylo zhodnotit efekt methylfenidátu na evokovanou bolest u kontrolních zvířat a u zvířat s CCI při použití různých testovacích metod:

- a. Efekt methylfenidátu na evokovanou bolest měřenou reflexními testy
 - i. Ovlivní methylfenidát tepelný práh bolesti u kontrolní skupiny a u skupiny CCI při použití metody Hargreavesova plantar testu?
 - ii. Ovlivní methylfenidát mechanický práh bolesti u kontrolní skupiny a u skupiny CCI při použití metody vonFrey ?
- b. Efekt methylfenidátu na evokovanou bolest měřenou operantní metodou TPP
 - i. Ovlivní methylfenidát teplotní preferenci u kontrolní skupiny a u skupiny CCI při použití metody TPP?

Druhým cílem práce bylo zhodnotit efekt methylfenidátu na spontánní bolest u modelu CCI.

- a. Efekt methylfenidátu na spontánní bolest měřenou operantní metodou CPP
 - ii. Vyvolá methylfenidát preferenci u kontrolní skupiny?
 - iii. Ovlivní methylfenidát spontánní bolest u skupiny CCI při použití metody CPP?

Třetím cílem práce bylo porovnat výsledky jednotlivých metodik měření bolesti při měření účinku methylfenidátu.

8. Materiál a metody

8.1 Zvířata

Ve studii byly použity dospělé samice laboratorního potkana kmene Wistar. Hmotnost samic byla mezi 310 – 415 g. Zvířata byla ustájena v chovných nádobách ve skupinách po třech a měla neomezený přístup ke krmivu a k vodě. Teplota okolí byla udržována v rozmezí 20 až 24°C. Zvířata měla obrácený režim světlo-tma 12:12 a veškeré testování probíhalo ve tmavé části cyklu.

Všechny experimenty byly provedeny se souhlasem Ministerstva zemědělství ČR a jsou v souladu s pokyny Etické komise Mezinárodní společnosti pro studium bolesti (Zimmermann, 1983).

8.2 Design experimentu

Pro testování evokované bolesti jsme zvířata v den 0 rozdělili na dvě skupiny tj. na kontrolní skupinu a na skupinu CCI a následně jsme u skupiny CCI provedli chronickou konstriktu ischiadického nervu. 10. a 14. den jsme měřili tepelný práh bolesti Hargreavesovým plantar testem, mechanický práh bolesti vonFreyovým testem a tepelnou preferenci metodou TPP u kontrolní skupiny a u skupiny CCI. Následně jsme aplikovali kontrolním zvířatům a zvířatům s CCI methylenfenidát (1 mg/kg s.c.) a po 30 minutách jsme všechna měření zopakovali. Měření proběhlo dvakrát s odstupem 4 dnů kvůli eliminaci vlivu estrálního cyklu samic. Naměřené hodnoty prahů bolesti byly zprůměrovány a porovnány statistickou analýzou.

Pro testování spontánní bolesti jsme zvířata v den 0 rozdělili na dvě skupiny tj. na kontrolní skupinu a na skupinu CCI, u které jsme provedli chronickou konstriktu ischiadického nervu. U kontrolní skupiny v den 0 a u skupiny CCI 14. den po operaci jsme zvířata habituovali na testovací zařízení CPP a naměřili jsme bazální míru preference. Další čtyři dny probíhalo podmiňování zvířat a pátý

den jsme provedli finální měření míry preference. Naměřené hodnoty preferencí byly zprůměrovány a porovnány statistickou analýzou.

8.3 Methylnfenidát

V našem experimentu byl použit methylphenidate hydrochlorid (Sigma Aldrich), který byl naředěn ve fyziologickém roztoku, tak aby výsledná koncentrace byla 1mg/ml. Methylnfenidát byl aplikován v dávce 1mg/kg, která ve studii Yamamotové et al. (2016) zvýšila analgetické vlastnosti morfinu a je nejvyšší dávkou nevyvolávající stereotypii. Methylnfenidát i fyziologický roztok byly aplikovány subkutánně v krční oblasti.

8.4 Modelace neuropatické bolesti

Periferní neuropatická bolest byla modelována podle postupu popsaného Benettem a Xiem (Benett a Xie, 1988). Anestezie u laboratorních zvířat byla navozena kombinací xylazinu (16 mg/kg) a ketaminu (100 mg/kg) aplikovaných intraperitoneálně společně v jedné injekční stříkačce. Pro zamezení vysychání rohovky byla aplikována oftalmologická mast (Ophtalmo-Azulen® Zentiva). Levá zadní noha byla oholena a vydesinfikována. Kaudálně od kyčelního kloubu byl proveden řez kůží a svaly kolmo ventrálně v délce asi 2 cm pro expozici levého ischiadického nervu. Nerv byl vypreparován, uvolněn od povázek a podvázán čtyřmi ligaturami vzdálenými asi 1 mm (viz obr. 4). Pro podvaz byl použit chromovaný catgut (Resocat®, 4-0) a ligatury byly jemně utaženy. Následně byly postupně zašity svaly (vstřebatelný PGA® resorba 3-0) a kůže (sešívačka kůže Medika Sunmedics Acos TM).



Obrázek 4 – Modelace neuropatické bolesti podvazem ischiadického nervu čtyřmi ligaturami ve vzdálenosti 1 mm podle metody Benetta a Xieho (1988).

8.5 Měření tepelného prahu bolesti

Evokovaná bolest byla měřena tepelnou stimulací Hargreavesovým plantar testem (Ugo Basile). Měřicí zařízení se skládá ze tří plastových boxů se skleněným, areflexivním dnem, tepelného zdroje záření a detekčního přístroje pro automatické zaznamenání latence ucuknutí končetiny. Zvířata mají v boxech umožněný volný pohyb. Po krátké habituaci jsme tepelný zdroj namířili přes skleněné dno na plantární povrch končetiny zvířete a spustili tepelnou stimulaci. Při zapnutí tepelného záření se automaticky spustil časovač a po reflexní reakci zvířete byla zaznamenána latence v sekundách. Maximální doba záření, při které byla tepelná stimulace ukončena (cut-off hodnota), byla nastavena na 22 sekund. Cut-off hladina stimulace byla nastavena pro zabránění případného poškození končetiny při absenci únikové reakce. Pro eliminaci případného zkreslení výsledků byl při měření povrch boxů udržován čistý a suchý. Měření proběhlo na každé zadní končetině 3x s dostatečným rozstupem mezi jednotlivými měřeními. Následně byl kontrolním zvířatům a zvířatům s CCI aplikován methyلفenidát a po 30 minutách bylo měření

obou zadních končetin 3x zopakováno. Pro pozdější analýzu jsme latence jednotlivých končetin ze všech měření zprůměrovali a dále tyto průměrné hodnoty popisujeme jako tepelný práh bolesti.

8.6 Měření mechanického prahu bolesti

Evokovaná bolest byla měřena mechanickou stimulací elektronickým vonFreyovým testem. Vlákno bylo aplikováno na dorsální povrch tlapky zvířete se zvyšující se silou do vyvolání únikové obranné reakce. Maximální použitá síla byla zaznamenána a zobrazena na obrazovce v gramech. Měření únikové reakce na nociceptivní mechanickou stimulaci proběhlo na každé zadní končetině 2x s dostatečným rozestupem mezi jednotlivými měřeními. Následně byl kontrolním zvířatům a zvířatům s CCI aplikován methylenfenidát a po 30 minutách bylo měření obou zadních končetin 2x zopakováno. Pro pozdější analýzu jsme hodnoty jednotlivých končetin ze všech měření zprůměrovali a dále tyto průměrné hodnoty popisujeme jako mechanický práh bolesti.

8.7 Metoda teplotní preference

Evokovaná bolest tepelnými stimuly byla také měřena metodou teplotní preference. V první fázi byla zvířata nejméně po 10 minut habituována na měřicí zařízení. Následně jsme dle preference zvířat zjišťovali teplotní nastavení ploten pro další měření. Teplá plotna byla nahřata na 45 °C, zatím co druhá plotna byla nastavena na 10 °C. Nad plotnami je umístěna kamera nahrávající pohyb zvířete mezi plotnami a dobu setrvání na jednotlivých plotnách, které automaticky zaznamenává pro off-line analýzu. Monitoring zvířat byl nastaven na 10 minut. S dostatečným časovým odstupem po prvním měření (1-2 hod), byl kontrolním zvířatům a zvířatům s CCI aplikován methylenfenidát a po 30 minutách bylo měření opakováno.

8.8 Metoda podmíněné preference místa

Spontánní bolest byla testována metodou podmíněné preference místa. V první fázi proběhla habituace zvířat na měřicí zařízení. Fáze habituace trvala celkem 45 minut u každého zvířete a skládala se ze tří 15 min sezení, při nichž se zvíře mohlo volně pohybovat po zařízení. Před aplikací látek u každé skupiny zvířat byla zjištěna bazální preference. Zvířata byla vkládána vždy do prostřední neutrální komůrky a měla umožněný pohyb po celém zařízení. Bazální měření probíhalo 15 minut. Zařízení CPP má v sobě zabudované fotobuňky, které registrují přítomnost zvířete, a které automaticky zaznamenají čas strávený v podmiňovacích komorách a počet vstupů do těchto komor. Další čtyři dny probíhalo podmiňování zvířat. Potkani byli umístěni vždy do jedné podmiňovací komory, byl jim zamezen vstup do střední a druhé komory a byla jim aplikována příslušná látka. Levá podmiňovací komora s vertikálními pruhy byla asociována s methylnfenidátem, zatímco pravá podmiňovací komora s horizontálními pruhy byla asociována s fyziologickým roztokem. Zvířata byla podmiňována každý den 60 minut dopoledne (v 9 hod) a každý den 60 minut odpoledne (v 16 hod) vždy ve stejný čas. V odpolední části byla aplikována opačná látka než v části dopoledního podmiňování. Polovině zvířat byl aplikován methylnfenidát dopoledne a druhé polovině byl methylnfenidát aplikován odpoledne. Pátý den bylo v poledne provedeno finální měření, při kterém zvířata měla umožněný volný pohyb po celém zařízení. Měření trvalo 15 minut a výsledky, jako jsou časy strávené v komorách a počet vstupů do komor, byly automaticky zaznamenány přístrojem.

9. Statistika

Výsledná data jsou uváděna jako aritmetické průměry \pm standardní chyba průměru. Statistická signifikace byla při porovnání prahů bolesti (vždy jsme porovnávali jen dvě hodnoty, např. levá vs. pravá končetina, končetina před aplikací vs. končetina po aplikaci methylnfenidátu, končetina kontrolní skupiny

vs. experimentální) vypočtena studentovým t-testem, při porovnání délky pobytu na jedné vs. na druhé ploténce neparametrickým Wilcoxonovým testem pro závislé proměnné. Veškeré statistické analýzy byly provedeny v programu Statistica 6.0. Za signifikantní byly považovány výsledky s $p < 0,05$.

10. Výsledky

10.1 Vliv CCI na evokovanou bolest

10.1.1 Vliv CCI na evokovanou bolest měřenou reflexními testy

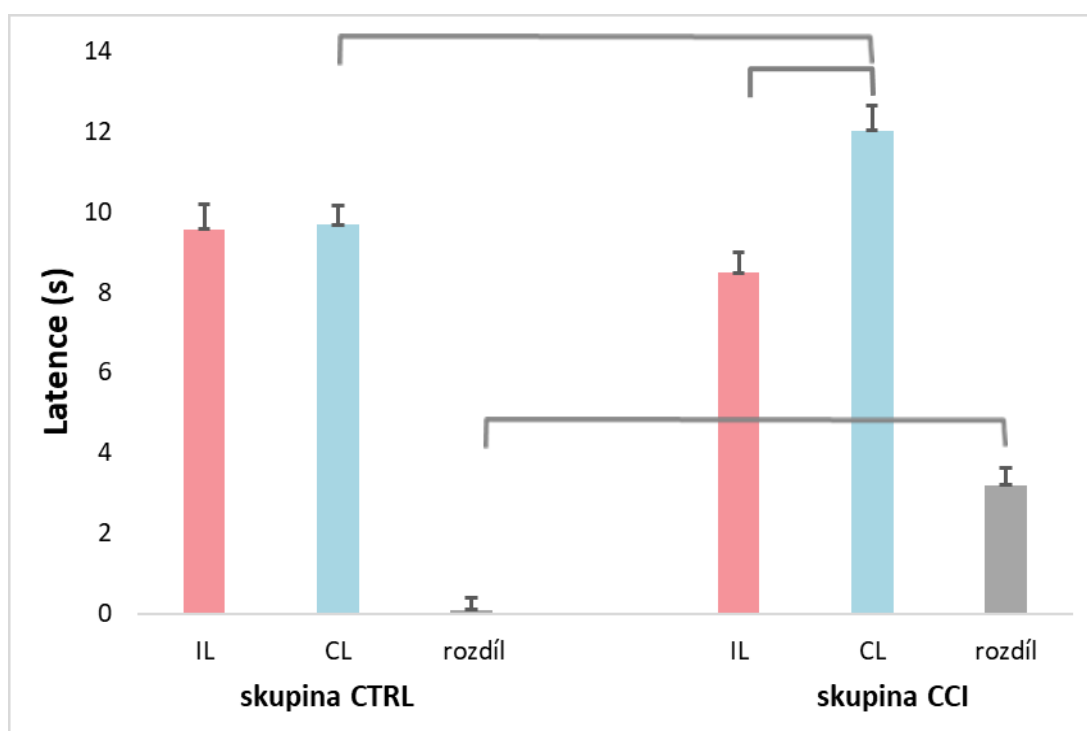
10.1.1.1 Hargreavesův plantar test

Pro testování tepelně evokované bolesti byla použita metoda měření tepelného prahu bolesti Hargreavesovým testem. Efekt CCI na teplem evokovanou bolest byl hodnocen u kontrolní skupiny ($n=6$) a u skupiny CCI ($n=12$) 10 a 14 dnů po operaci jednak porovnáním prahu mezi levou a pravou končetinou v rámci skupiny, jednak porovnáním prahu každé končetiny mezi skupinami a nakonec porovnáním rozdílu prahu končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) mezi skupinami.

U kontrolní skupiny byl tepelný práh bolesti na levé a na pravé končetině $9,57 \pm 0,61$ s a $9,67 \pm 0,48$ s, v uvedeném pořadí. Práh bolesti levé a pravé končetiny se nelišil ($p=0,77$).

U skupiny CCI byl tepelný práh bolesti na ipsilaterální a na kontralaterální končetině $8,48 \pm 0,50$ s a $12,01 \pm 0,62$ s, v uvedeném pořadí. Tepelný práh bolesti na ipsilaterální končetině byl signifikantně nižší než na kontralaterální končetině ($p < 0,001$).

Při porovnání skupiny CCI s kontrolní skupinou jsme zjistili, že u skupiny CCI tepelný práh bolesti na ipsilaterální končetině nesignifikantně klesl oproti levé končetině kontrolní skupiny (u kontrolních zvířat byl $9,57 \pm 0,61$ s a u skupiny CCI byl $8,48 \pm 0,50$ s, $p=0,09$). Dále jsme zjistili, že u skupiny CCI byl tepelný práh bolesti na kontralaterální končetině signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (u kontrolních zvířat byl $9,67 \pm 0,48$ s a u skupiny CCI byl $12,01 \pm 0,62$ s, $p=0,004$) (viz obr. 5). Také rozdíl prahu končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) byl u skupiny CCI signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (rozdíl prahu končetin byl u kontrolních zvířat $0,1 \pm 0,3$ s a u skupiny CCI $3,20 \pm 0,41$ s, $p<0,001$).



Obrázek 5 – Znázornění tepelného prahu bolesti měřeného Hargreavesovým testem u kontrolních zvířat (skupina CTRL vlevo) a u skupiny s chronickou konstrikcí ischiadického nervu (skupina CCI vpravo) na ipsilaterální (IL) a kontralaterální (CL) končetině včetně rozdílů latencí mezi IL a CL. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty se standardní chybou průměru (SEM) a úsečky označují signifikantní rozdíl ($p<0,05$).

Závěrem můžeme shrnout, že CCI vyvolalo termální hypersenzitivitu a signifikantní rozdíl tepelného prahu bolesti mezi ipsilaterální a kontralaterální končetinou. Z porovnání mezi kontrolní skupinou a skupinou CCI vyplývá, že tento rozdíl je vyvolán jak poklesem latence na ipsilaterálních končetinách, tak i vzestupem latence na kontralaterálních končetinách.

10.1.1.2 Test VonFrey

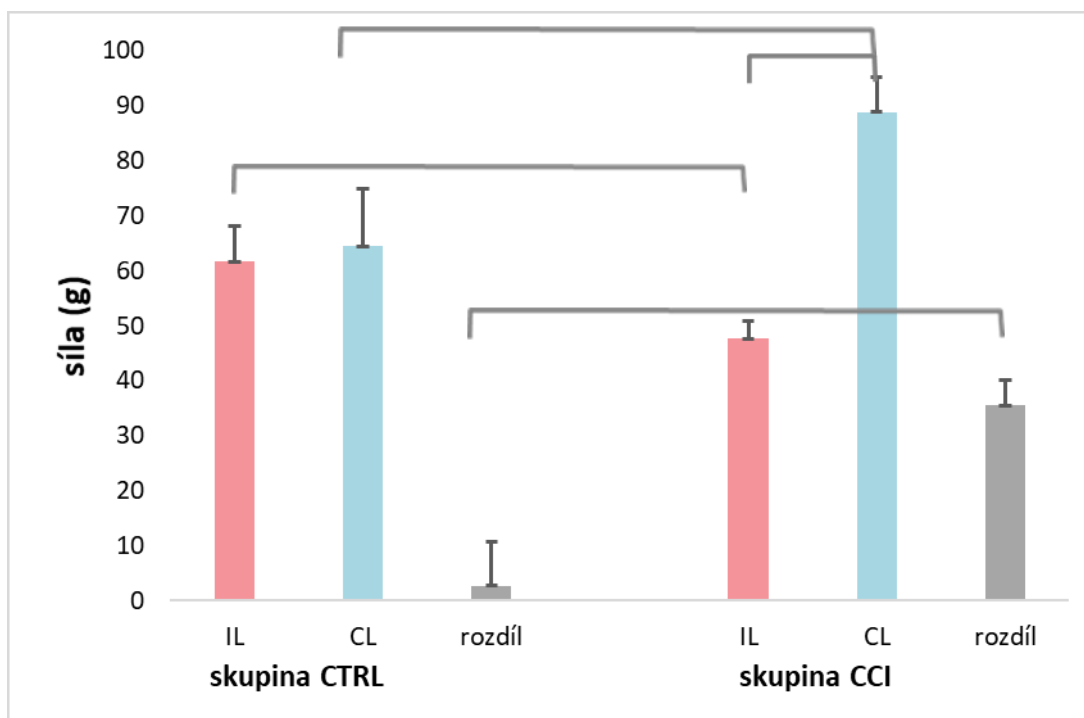
Pro testování mechanicky evokované bolesti byla použita metoda měření mechanického prahu bolesti vonFreyovým testem. Efekt CCI na mechanicky evokovanou bolest byl hodnocen u kontrolní skupiny ($n=6$) a u skupiny CCI ($n=12$) 10 a 14 dnů po operaci stejně jako u Hargreavesova testu, tj. jednak porovnáním prahu mezi levou a pravou končetinou v rámci obou skupin, jednak porovnáním prahu každé končetiny mezi skupinami a nakonec porovnáním rozdílu prahu končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) mezi skupinami.

U kontrolní skupiny byl mechanický práh bolesti levé a pravé končetiny $61,69 \pm 6,50$ g a $64,46 \pm 10,51$ g, v uvedeném pořadí. Práh bolesti levé a pravé končetiny se nelišil ($p=0,83$).

U skupiny CCI byl mechanický práh bolesti na ipsilaterální a na kontralaterální končetině $47,67 \pm 3,26$ g a $88,88 \pm 6,3$ g, v uvedeném pořadí. Mechanický práh bolesti na ipsilaterální končetině byl signifikantně nižší než na kontralaterální končetině ($p<0,001$).

Při porovnání skupiny CCI s kontrolní skupinou jsme zjistili, že u skupiny CCI byl mechanický práh bolesti na ipsilaterální končetině nižší než na levé končetině u kontrolní skupiny (u kontrolních zvířat byl $61,69 \pm 6,50$ g a u skupiny CCI byl $47,67 \pm 3,26$ g, $p=0,02$). Dále jsme zjistili, že u skupiny CCI byl mechanický práh bolesti na kontralaterální končetině signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (u kontrolních zvířat byl $64,46 \pm 10,51$ g a u skupiny CCI byl $88,88 \pm 6,3$ g, $p=0,007$) (viz obr. 6). Také rozdíl prahů končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální

mínus levé, ipsilaterální končetiny) byl u skupiny CCI signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (rozdíl prahů končetin byl u kontrolních zvířat $2,77 \pm 8,01$ g a u zvířat ze skupiny CCI $35,49 \pm 4,57$ g, $p=0,001$).



Obrázek 6 – Znázornění mechanického prahu bolesti měřeného vonFreyovým testem u kontrolních zvířat (skupina CTRL vlevo) a u skupiny s chronickou konstrikcí ischiadického nervu (skupina CCI vpravo) na ipsilaterální (IL) a kontralaterální (CL) končetině včetně rozdílů prahů bolesti IL a CL. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty + SEM a úsečky označují signifikantní rozdíl ($p < 0,05$). Po podvazu měla skupina CCI nižší mechanický práh bolesti na IL končetině oproti CL končetině ($p < 0,001$). V porovnání s CTRL skupinou měla skupina CCI po podvazu signifikantně vyšší práh bolesti na CL končetině ($p=0,007$) a nižší práh na IL ($p=0,02$). Rozdíl prahů končetin je u skupiny CCI signifikantně vyšší než u kontrol ($p=0,001$).

Závěrem můžeme shrnout, že CCI vyvolalo mechanickou hypersenzitivitu a signifikantní rozdíl mechanického prahu bolesti mezi ipsilaterální a kontralaterální

končetinou. Z porovnání mezi kontrolní skupinou a skupinou CCI vyplývá, že tento rozdíl je vyvolán jak poklesem latence na ipsilaterálních končetinách, tak i vzestupem latence na kontralaterálních končetinách.

Závěr reflexních metod měření prahu bolesti

CCI vyvolalo mechanickou i termální hypersenzitivitu. Ipsilaterální končetiny zvířat po CCI měly oproti kontralaterálním končetinám signifikantně nižší jak tepelný, tak i mechanický práh bolesti. Tento rozdíl byl způsoben jak poklesem prahu bolesti na ipsilaterální končetině tak i jeho vzestupem na kontralaterální končetině.

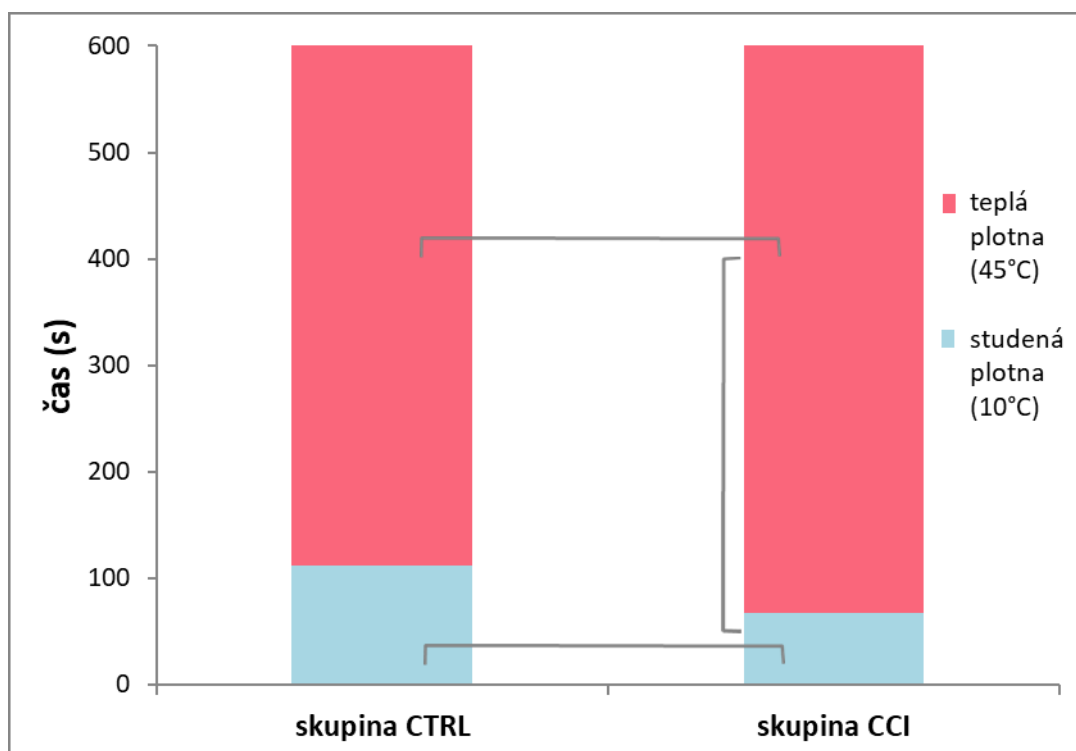
10.1.2 Vliv CCI na evokovanou bolest měřenou operantní metodou TPP

Pro testování tepelně evokované bolesti byla použita operantní metoda TPP. Efekt CCI na míru preference byl hodnocen u kontrolní skupiny (n=6) a u skupiny CCI (n=12) 10 a 14 dnů po operaci jednak porovnáním času stráveného na studené a teplé ploténce, jednak porovnáním času stráveného na každé ploténce mezi skupinami.

Kontrolní skupina strávila na studené a na teplé ploténce $111,25 \pm 2,95$ s a $489,75 \pm 2,95$ s, v uvedeném pořadí. Doba strávená na studené a teplé ploténce se nelišila ($p=0,13$).

Skupina CCI strávila na studené a na teplé ploténce $66,5 \pm 9,21$ s a $534,5 \pm 9,21$ s, v uvedeném pořadí. Doba strávená na studené ploténce byla signifikantně nižší oproti době strávené na teplé ploténce ($p=0,01$).

Při porovnání skupiny CCI s kontrolní skupinou jsme zjistili, že skupina CCI trávila na studené ploténce signifikantně méně času než kontrolní skupina (skupina CCI $66,5 \pm 9,21$ s; kontrolní skupina $111,25 \pm 2,95$ s, $p=0,02$) a analogicky signifikantně více času na teplé ploténce (skupina CCI $534,5 \pm 9,21$ s; kontrolní skupina $489,75 \pm 2,95$ s, $p=0,004$) (viz obr. 7).



Obrázek 7 – Znázornění teplotní preference u kontrolní skupiny zvířat (skupina CTRL) a u zvířat s chronickou konstrikcí (skupina CCI). Skupina CCI strávila signifikantně méně času na studené ploténce oproti teplé ploténce ($p=0,01$) a zároveň signifikantně méně času na studené ($p=0,02$) a více času na teplé ploténce ($p=0,004$) oproti skupině CTRL. Úsečky označují signifikantní rozdíl ($p<0,05$).

Závěrem můžeme shrnout, že zvířata s CCI trávila méně času na studené a více času na teplé ploténce.

10.2 Vliv methylfenidátu na evokovanou bolest

10.2.1 Vliv methylfenidátu na evokovanou bolest měřenou reflexními testy

10.2.1.1 Hargreavesův plantar test

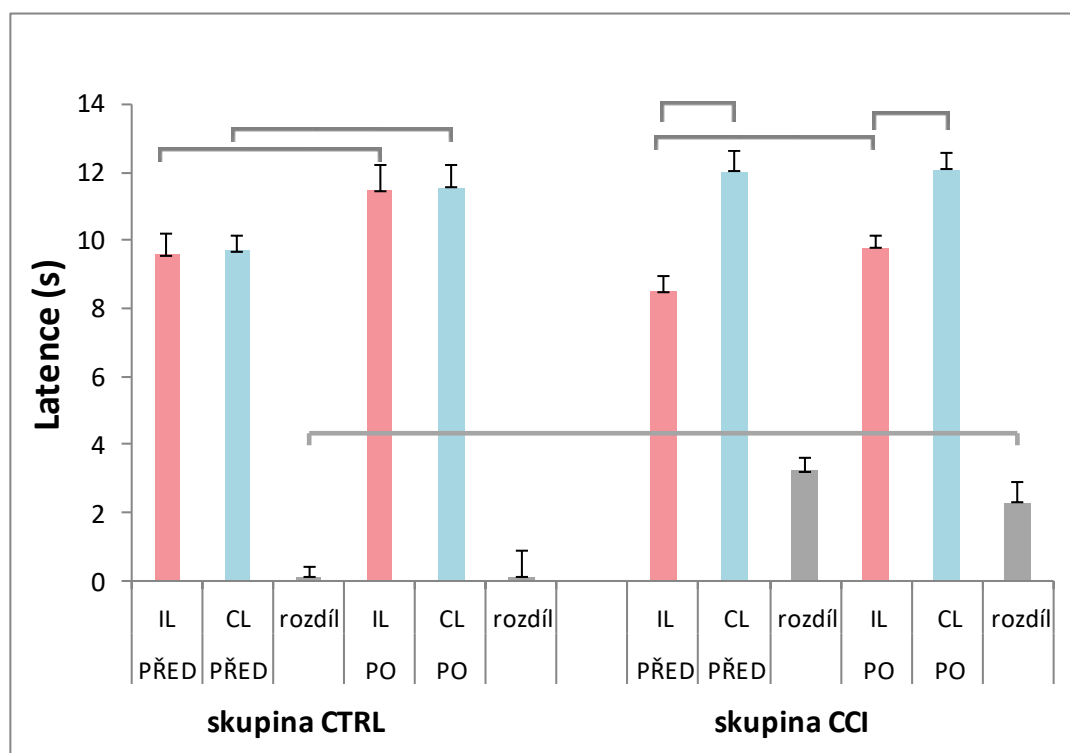
Efekt methylfenidátu na teplem evokovanou bolest byl měřen pomocí Hargreavesova testu u kontrolní skupiny ($n=6$) a u skupiny CCI ($n=12$) 10 a 14 dnů po operaci. Pro hodnocení jeho efektu jsme porovnali jednak práh bolesti každé končetiny před a po aplikaci methylfenidátu v rámci každé skupiny, jednak rozdíl prahu končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) před a po aplikaci methylfenidátu v rámci každé skupiny. Nakonec jsme porovnali práh bolesti každé končetiny a rozdíl prahů končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) před a po aplikaci methylfenidátu mezi skupinami.

U kontrolní skupiny byl tepelný práh bolesti obou končetin po aplikaci methylfenidátu signifikantně vyšší než před aplikací methylfenidátu (tepelný práh bolesti levé končetiny byl před aplikací $9,57 \pm 0,61$ s a po aplikaci $11,45 \pm 0,76$ s, $p=0,008$; tepelný práh bolesti pravé končetiny byl před aplikací $9,67 \pm 0,48$ s a po aplikaci $11,56 \pm 0,68$ s, $p=0,01$) (viz obr. 8). Rozdíl prahů končetin (práh bolesti pravé mínus levé končetiny) se po aplikaci methylfenidátu nezměnil (před aplikací byl $0,1 \pm 0,3$ s a po aplikaci byl $0,11 \pm 0,79$ s, $p=0,99$). Dále jsme u kontrolní skupiny potvrdili, že práh levé končetiny byl stejný jako práh pravé končetiny a to jak před aplikací, tak i po aplikaci methylfenidátu (před aplikací byl $9,57 \pm 0,61$ s a $9,67 \pm 0,48$ s, $p=0,90$ a po aplikaci byl $11,45 \pm 0,76$ s a $11,56 \pm 0,68$ s, $p=0,92$ pro levou a pravou končetinu, v uvedeném pořadí).

U skupiny CCI byl tepelný práh bolesti ipsilaterální končetiny po aplikaci methylfenidátu signifikantně vyšší než před aplikací methylfenidátu (před aplikací byl $8,48 \pm 0,50$ s a po aplikaci byl $9,78 \pm 0,37$ s, $p=0,04$). Na kontralaterální končetině se tepelný práh po aplikaci methylfenidátu nelišil od prahu před aplikací

(před aplikací byl $12,01 \pm 0,62$ s a po aplikaci byl $12,07 \pm 0,52$ s, $p=0,94$) (viz obr. 8). Rozdíl prahů končetin (práh bolesti kontralaterální mínus ipsilaterální končetiny) se sice snížil, ale statisticky nevýznamně (před aplikací byl $3,20 \pm 0,41$ s a po aplikaci byl $2,29 \pm 0,61$ s, $p=0,2$). Dále jsme u skupiny CCI zjistili, že práh ipsilaterální končetiny byl nižší než na kontralaterální končetině a to jak před aplikací, tak i po aplikaci methylnfenidátu (před aplikací byl $8,48 \pm 0,50$ s a $12,01 \pm 0,62$ s, $p<0,001$ a po aplikaci byl $9,78 \pm 0,37$ s a $12,07 \pm 0,52$ s, $p=0,001$ pro ipsilaterální a kontralaterální končetinu, v uvedeném pořadí).

Při porovnání skupiny CCI s kontrolní skupinou jsme zjistili, že se u skupiny CCI tepelný práh bolesti na ipsilaterální končetině po aplikaci methylnfenidátu neliší od prahu bolesti levé končetiny kontrolní skupiny před aplikací methylnfenidátu (u skupiny CCI po aplikaci methylnfenidátu byl $9,78 \pm 0,37$ s a u kontrolní skupiny před aplikací methylnfenidátu byl $9,57 \pm 0,61$ s, $p=0,78$), na rozdíl od kontralaterální končetiny, kde jsme zjistili, že u skupiny CCI se oba prahy bolesti (tj. před $12,01 \pm 0,62$ s a po $12,07 \pm 0,52$ s aplikaci methylnfenidátu) neliší od kontrolní skupiny po aplikaci methylnfenidátu ($11,56 \pm 0,68$ s, $p=0,68$ a $p=0,60$; v uvedeném pořadí). Rozdíl prahů končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) byl u skupiny CCI po aplikaci methylnfenidátu stále signifikantně vyšší oproti rozdílu prahů bolesti mezi pravou a levou končetinou u kontrolní skupiny před aplikací methylnfenidátu (u skupiny CCI byl po aplikaci $2,29 \pm 0,61$ s a u kontrolní skupiny byl před aplikací $0,1 \pm 0,3$ s, $p=0,045$) (viz obr. 8).



Obrázek 8 – Znázornění tepelného prahu bolesti měřeného Hargreavesovým testem u kontrolních zvířat (skupina CTRL vlevo) a skupiny s chronickou konstrikcí ischiadického nervu (skupina CCI vpravo). V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty ipsilaterální (IL) a kontralaterální (CL) končetiny před a po aplikaci methylfenidátu včetně rozdílů prahů bolesti IL a CL, chybové úsečky zobrazující SEM a úsečky označující signifikantní rozdíl ($p < 0,05$). U skupiny CTRL došlo po aplikaci methylfenidátu k signifikantnímu zvýšení prahu bolesti na IL a CL končetině ($p = 0,008$; $p = 0,01$). U skupiny CCI se po aplikaci methylfenidátu sice práh IL končetiny signifikantně zvýšil ($p = 0,04$), ale práh bolesti IL končetiny je po aplikaci methylfenidátu stále signifikantně nižší oproti CL končetině ($p = 0,001$).

Závěrem můžeme shrnout, že methylfenidát u kontrolní skupiny vyvolal zvýšení tepelného prahu bolesti obou končetin, zatímco u skupiny CCI vyvolal zvýšení tepelného prahu bolesti jen u ipsilaterální končetiny, i když práh bolesti ipsilaterální končetiny byl stále nižší oproti kontralaterální končetině. Z porovnání mezi kontrolní skupinou a skupinou CCI vyplývá, že methylfenidát nezměnil rozdíl mezi prahu bolesti.

10.2.1.2 Test vonFrey

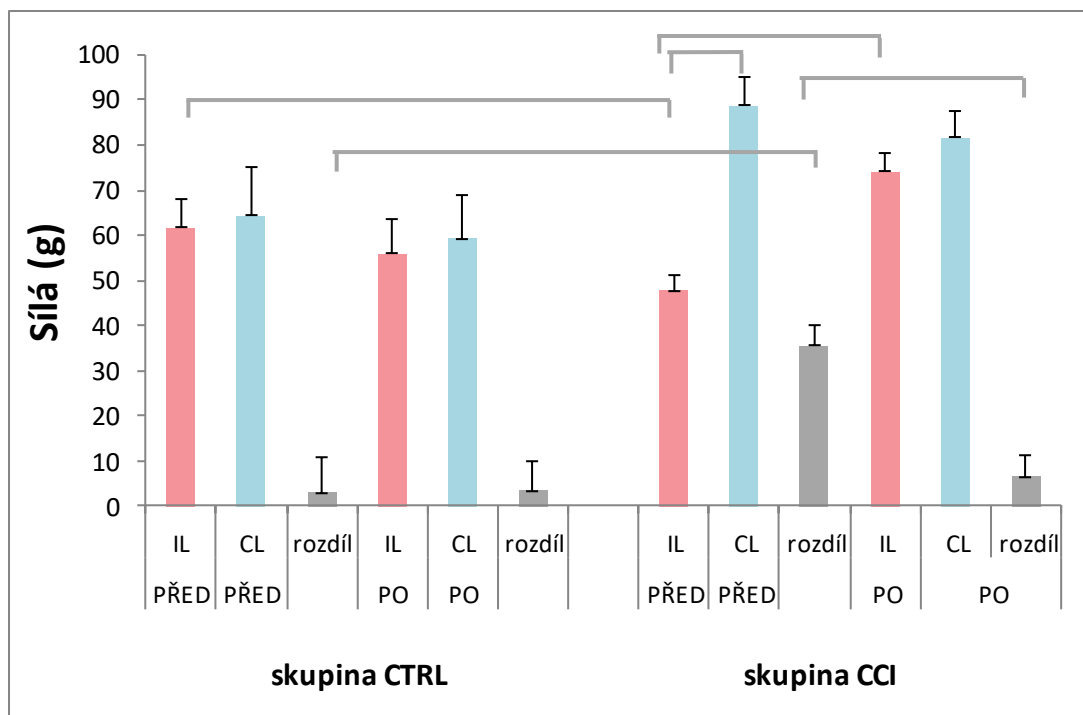
Efekt methylnfenidátu na mechanicky evokovanou bolest byl měřen pomocí testu vonFreyovým vláknem u kontrolní skupiny (n=6) a u skupiny CCI (n=12) 10 a 14 dnů po operaci. Pro hodnocení jeho efektu jsme porovnali jednak práh bolesti každé končetiny před a po aplikaci methylnfenidátu v rámci každé skupiny, jednak rozdíl prahu končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) před a po aplikaci methylnfenidátu v rámci každé skupiny. Nakonec jsme porovnali práh bolesti každé končetiny a rozdíl prahů prahu končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) před a po aplikaci methylnfenidátu mezi skupinami.

U kontrolní skupiny se mechanický práh bolesti obou končetin po aplikaci methylnfenidátu nelišil od prahů bolesti před aplikací methylnfenidátu (mechanický práh bolesti levé končetiny byl před aplikací $61,69 \pm 6,5$ g a po aplikaci $55,94 \pm 7,66$ g, $p=0,58$; mechanický práh bolesti pravé končetiny byl před aplikací $64,46 \pm 10,51$ g a po aplikaci $59,19 \pm 9,92$ g, $p=0,72$) (viz obr. 9). Rozdíl prahů končetin (práh bolesti pravé mínus levé končetiny) se před a po aplikaci methylnfenidátu nelišil (před aplikací byl $2,77 \pm 8,01$ g a po aplikaci byl $3,25 \pm 6,51$ g, $p=0,96$). Dále jsme u kontrolní skupiny potvrdili, že práh levé končetiny byl stejný jako práh pravé končetiny, a to jak před aplikací, tak i po aplikaci methylnfenidátu (před aplikací $61,69 \pm 6,5$ g a $64,46 \pm 10,51$ g, $p=0,83$ a po aplikaci $55,94 \pm 7,66$ g a $59,19 \pm 9,92$ g, $p=0,80$ pro levou a pravou končetinu, v uvedeném pořadí).

U skupiny CCI byl mechanický práh bolesti na ipsilaterální končetině po aplikaci methylnfenidátu signifikantně vyšší než před aplikací methylnfenidátu (před aplikací byl $47,67 \pm 3,26$ g a po aplikaci byl $74,09 \pm 4,21$ g, $p<0,001$). Na kontralaterální končetině se mechanický práh po aplikaci methylnfenidátu nelišil od prahu před aplikací (před aplikací byl $88,88 \pm 6,3$ g a po aplikaci byl $81,59 \pm 5,82$ g, $p=0,4$) (viz obr. 9). Rozdíl prahů končetin (práh bolesti kontralaterální mínus ipsilaterální končetiny) byl po aplikaci methylnfenidátu signifikantně nižší než před aplikací (před aplikací byl $35,49 \pm 4,57$ g a po aplikaci

byl $6,32 \pm 5,04$ g, $p < 0,001$). Dále jsme u skupiny CCI zjistili, že před aplikací methylfenidátu byl práh ipsilaterální končetiny nižší než práh kontralaterální končetiny ($47,67 \pm 3,26$ g a $88,88 \pm 6,3$ g, $p < 0,001$ pro ipsilaterální a kontralaterální končetinu, v uvedeném pořadí), zatímco po aplikaci methylfenidátu byl práh ipsilaterální a kontralaterální končetiny stejný ($74,09 \pm 4,21$ g a $81,59 \pm 5,82$ g, $p = 0,3$ pro ipsilaterální a kontralaterální končetinu, v uvedeném pořadí).

Při porovnání skupiny CCI s kontrolní skupinou jsme zjistili, že u skupiny CCI se mechanický práh bolesti na ipsilaterální končetině po aplikaci methylfenidátu nelišil od prahu bolesti levé končetiny kontrolní skupiny před aplikací methylfenidátu (u skupiny CCI po aplikaci $74,09 \pm 4,21$ g a u kontrolní skupiny před aplikací $61,69 \pm 6,5$ g, $p = 0,13$), u kontralaterální končetiny jsme zjistili, že u skupiny CCI se práh bolesti po aplikaci methylfenidátu nelišil od prahu bolesti pravé končetiny kontrolní skupiny před aplikací methylfenidátu (u skupiny CCI po aplikaci $81,59 \pm 5,82$ g a u kontrolní skupiny před aplikací $64,46 \pm 10,51$ g, $p = 0,15$). Rozdíl prahů končetin (práh bolesti pravé, kontralaterální mínus levé, ipsilaterální končetiny) u skupiny CCI po aplikaci methylfenidátu se nelišil od rozdílu mezi pravou a levou končetinou u kontrolní skupiny před aplikací methylfenidátu (u skupiny CCI po $6,32 \pm 5,04$ g a u kontrolní skupiny před $2,77 \pm 8,01$ g, $p = 0,7$) (viz obr. 9).



Obrázek 9 – Znázornění mechanického prahu bolesti měřeného vonFrey testem u kontrolních zvířat (skupina CTRL vlevo) a u skupiny s chronickou konstrikcí ischiadického nervu (skupina CCI vpravo). V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty ipsilaterální (IL) a kontralaterální (CL) končetiny před a po aplikaci methylfenidátu včetně rozdílů prahů bolesti IL a CL, chybové úsečky zobrazující SEM a úsečky označující signifikantní rozdíl ($p < 0,05$). U skupiny CTRL se mechanický práh bolesti u IL a CL končetiny před a po aplikaci methylfenidátu nelišil ($p = 0,58$; $p = 0,72$). U skupiny CCI se po aplikaci methylfenidátu práh IL končetiny signifikantně zvýšil ($p < 0,001$). Na CL končetině se práh bolesti po aplikaci methylfenidátu nelišil ($p = 0,4$).

Závěrem můžeme shrnout, že methylfenidát u kontrolní skupiny neovlivnil mechanické prahy bolesti, zatímco u skupiny CCI vyvolal zvýšení mechanického prahu bolesti u ipsilaterální končetiny a eliminoval tím jak rozdíl mezi ipsilaterální a kontralaterální končetinou, tak i rozdíl mezi ipsilaterální končetinou a levou končetinou kontrolní skupiny.

Závěr reflexních metod měření prahu bolesti

U kontrolní skupiny methylnfenidát zvýšil tepelný práh bolesti obou končetin, zatímco na mechanický práh bolesti neměl žádný efekt.

U skupiny CCI methylnfenidát vyvolal zvýšení jak tepelného tak i mechanického prahu bolesti, a to pouze na ipsilaterální končetině. Zatímco u mechanického prahu to vedlo k úplné eliminaci vlivu CCI (tj. k vyrovnání prahů obou končetin, eliminaci rozdílů prahů končetin a k eliminaci rozdílu mechanického prahu od kontrolních zvířat), u tepelného prahu bolesti zůstal efekt CCI vyjádřen i po aplikaci methylnfenidátu.

10.2.2 Vliv methylnfenidátu na evokovanou bolest měřenou operantním testem TPP

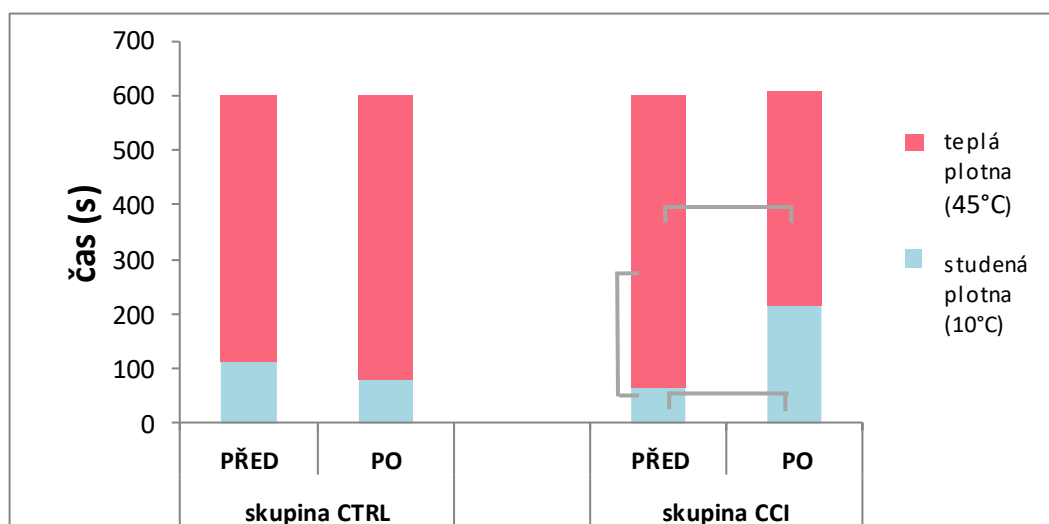
Efekt methylnfenidátu na teplem evokovanou bolest byl měřen pomocí TPP u kontrolní skupiny (n=6) a u skupiny CCI (n=12) 10 a 14 dnů po operaci. Pro hodnocení jeho efektu jsme porovnali jednak čas strávený na studené oproti času strávenému na teplé ploténce v rámci skupiny, a to před a po aplikaci methylnfenidátu a jednak čas strávený na studené a teplé ploténce před a po aplikaci methylnfenidátu, a to jak v rámci skupiny, tak i mezi skupinami.

Kontrolní skupina strávila před i po aplikaci methylnfenidátu stejný čas na studené jako na teplé ploténce (před aplikací trávila na studené $111,25 \pm 2,95$ s a na teplé ploténce $489,75 \pm 2,96$ s, $p=0,13$; po aplikaci trávila na studené ploténce $81,0 \pm 25,33$ s a na teplé ploténce $521,2 \pm 24,69$ s, $p=0,07$). Délka pobytu na studené i na teplé ploténce se ani před a ani po aplikaci methylnfenidátu nelišila (zvířata trávila na studené ploténce před aplikací $111,25 \pm 2,95$ s a po aplikaci $81,0 \pm 25,33$ s, $p=0,2$; před aplikací trávila na teplé $489,75 \pm 2,96$ s a po aplikaci $521,2 \pm 24,69$ s, $p=0,19$) (viz obr. 10).

Skupina CCI strávila před aplikací methylnfenidátu méně času na studené ploténce a tedy více času na teplé ploténce, ale po aplikaci methylnfenidátu trávila

na obou ploténkách stejný čas (před aplikací trávil zvířata na studené ploténce $66,5 \pm 9,21$ s a na teplé ploténce $534,5 \pm 9,21$ s, $p=0,01$; po aplikaci trávil na studené ploténce $216,5 \pm 76,19$ s a na teplé ploténce $394,5 \pm 71,52$ s, $p=0,72$). Po aplikaci methylfenidátu trávil zvířata s CCI signifikantně více času na studené ploténce než před aplikací (před aplikací trávil zvířata na studené ploténce $66,5 \pm 9,21$ s a po aplikaci $216,5 \pm 76,19$ s, $p=0,02$) a analogicky signifikantně méně času na teplé ploténce než před aplikací (před aplikací $534,5 \pm 9,21$ s a po aplikaci $394,5 \pm 71,52$ s, $p=0,03$) (viz obr. 10).

Při porovnání skupiny CCI s kontrolní skupinou jsme zjistili, že skupina CCI tráví stejně času na studené ploténce po aplikaci methylfenidátu jako kontrolní skupina před aplikací methylfenidátu (po aplikaci trávil skupina CCI na studené ploténce $216,5 \pm 76,19$ s a před aplikací trávil kontrolní skupina na studené ploténce $111,25 \pm 2,95$ s, $p=0,36$) a analogicky stejně času na teplé ploténce po aplikaci methylfenidátu jako kontrolní skupina před aplikací methylfenidátu (po aplikaci trávil skupina CCI na teplé ploténce $394,5 \pm 71,52$ s a před aplikací trávil kontrolní skupina na teplé ploténce $489,75 \pm 2,96$ s, $p=0,38$).



Obrázek 10 – Teplotní preference u kontrolní skupiny zvířat (skupina CTRL) a u zvířat s chronickou konstrikcí (skupina CCI) před a po aplikaci methylfenidátu. U skupiny CTRL nedošlo po aplikaci methylfenidátu ke změně preference. Skupina CCI trávila po aplikaci methylfenidátu více času na studené plotně ($p=0,03$). Délka pobytu mezi studenou a teplou plotenkou se před aplikací methylfenidátu lišila ($p=0,01$), po aplikaci byl rozdíl nesignifikantní ($p=0,72$). Úsečky označují signifikantní rozdíl ($p<0,05$).

Závěrem můžeme shrnout, že methylfenidát u kontrolní skupiny nevyvolal změnu preference, zatímco u skupiny CCI eliminoval efekt CCI.

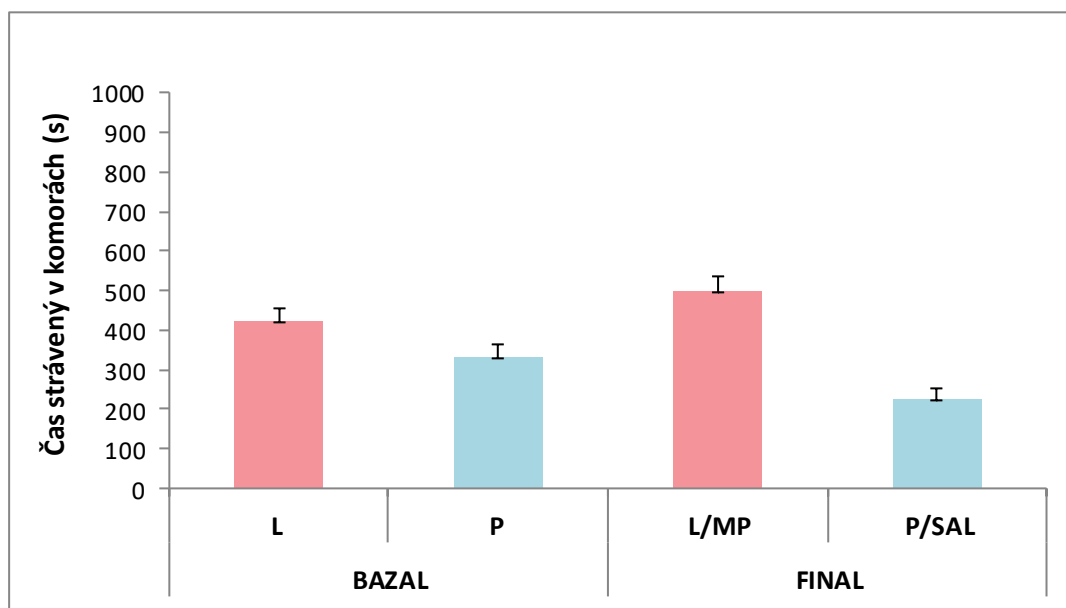
10.3 Efekt CCI na spontánní bolest

10.3.1.1 CPP – preference pro methylfenidát u kontrolních zvířat

Nejprve jsme museli potvrdit, že methylfenidát nevyvolá preferenci sám o sobě. U kontrolní skupiny (n=6) jsme porovnali čas strávený v jedné komoře s časem stráveným v druhé komoře CPP, a to před a po podmiňování s methylfenidátem.

Při bazálním měření, před podmiňováním, zvířata strávila v levé (kde bude aplikován methylfenidát) a v pravé (kde bude aplikován fyziologický roztok) podmiňovací komoře $422 \pm 31,89$ s a $331 \pm 31,83$ s, v uvedeném pořadí. Po podmiňování byla naměřena délka pobytu v levé a v pravé komoře $495,8 \pm 41,12$ s a $224,5 \pm 28,05$ s, v uvedeném pořadí (viz obr. 11). Doba strávená v levé komoře před a po podmiňování s methylfenidátem se nezměnila ($p=0,18$).

Závěrem můžeme shrnout, že methylfenidát u kontrolní skupiny nevyvolal preferenci a nepůsobí jako atraktant.



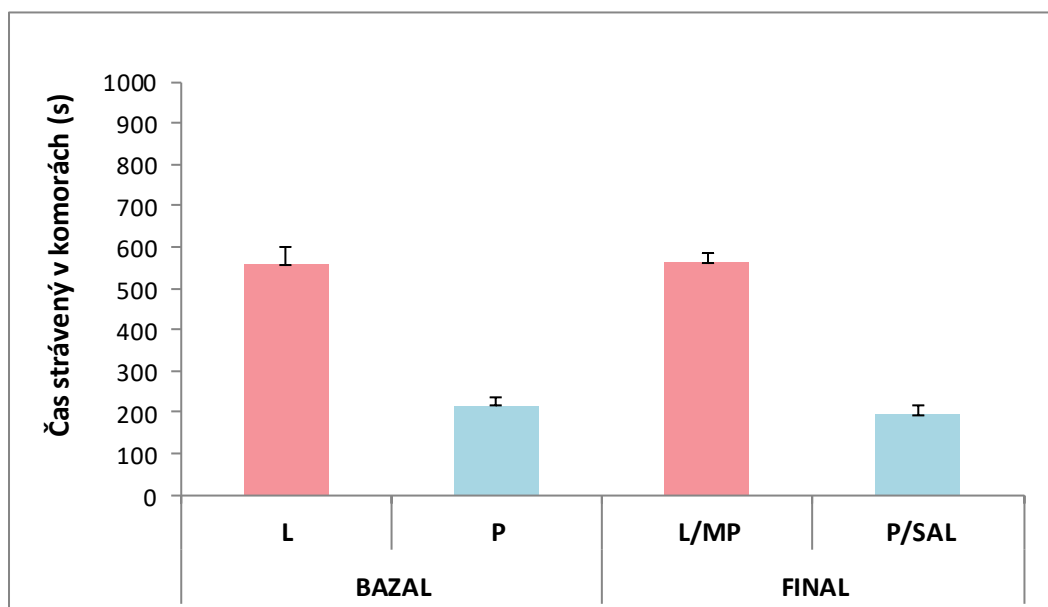
Obrázek 11 – Podmíněná preference místa u kontrolní skupiny. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty času stráveného v levé a pravé komoře před podmiňováním (BAZAL) a po podmiňování (FINAL) a chybové úsečky zobrazující SEM. Levá komora (L) byla asociována s methylfenidátem (MP) a pravá komora (P) byla asociována s fyziologickým roztokem (SAL). Obsazenost levé komory zůstala po podmiňování nezměněna ($p=0,18$).

10.3.1.2 CPP – preference pro methylfenidát u zvířat s CCI

U skupiny CCI ($n=6$) jsme porovnali čas strávený v jedné komoře s časem stráveným v druhé komoře CCP před a po podmiňování s methylfenidátem.

Při bazálním měření zvířata strávila v levé (kde bude aplikován methylfenidát) a v pravé (kde bude aplikován fyziologický roztok) podmiňovací komoře $558 \pm 43,37$ s a $215 \pm 20,78$ s, v uvedeném pořadí. Po podmiňování byla naměřena délka pobytu v levé a v pravé komoře $561 \pm 25,35$ s a $195 \pm 19,24$ s, v uvedeném pořadí (viz obr. 12). Doba strávená v levé a v pravé komoře před a po podmiňování s methylfenidátem se nezměnila ($p=0,95$; $p=0,49$; v uvedeném pořadí).

Závěrem můžeme shrnout, že methylfenidát u skupiny CCI nevyvolal změnu míry preference.



Obrázek 12 – Podmíněná preference místa u skupiny CCI. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty času stráveného v levé a pravé komoře před podmiňováním (BAZAL) a po podmiňování (FINAL) a chybové úsečky zobrazující SEM. Levá komora (L) byla asociována s methylfenidátem (MP) a pravá komora (P) byla asociována s fyziologickým roztokem (SAL). Obsazenosti komor zůstaly po podmiňování nezměněny ($p=0,95$; $p=0,49$).

11. Diskuze

V této práci jsme hodnotili efekt methylfenidátu jednak na evokovanou bolest u skupiny potkanů s neuropatickou bolestí a u kontrolní skupiny a jednak na spontánní bolest u potkanů s neuropatickou bolestí. Neuropatická bolest byla modelována metodou CCI. Efekt methylfenidátu na evokovanou bolest byl hodnocen jak tepelnými a mechanickými testy prahu bolesti založenými na spinálním reflexu, tak i tepelnou operantní metodou vyžadující supraspinální a korové zpracování. Efekt methylfenidátu na spontánní bolest byl hodnocen operantní metodou.

Výsledky této práce jsou:

1. CCI vyvolalo snížení tepelného a mechanického prahu bolesti (termální a mechanická hypersenzitivita) na ipsilaterální končetině a zvýšení prahů bolesti na kontralaterální končetině
2. Tepelný práh měřený reflexním plantar testem: methylfenidát zvýšil tepelný práh bolesti u kontrolní skupiny zvířat, ale neměl vliv na termální hypersenzitivitu CCI
3. Mechanický práh měřený reflexním vonFreyovým testem: methylfenidát nevyvolal změnu mechanického prahu bolesti u kontrolních zvířat, ale eliminoval mechanickou hypersenzitivitu CCI
4. Operantní metodou měřená tepelná preference: methylfenidát nevyvolal změnu tepelné preference u kontrolních zvířat, ale eliminoval chladovou alodynii u zvířat s CCI
5. Spontánní bolest měřená operantní metodou CPP: methylfenidát u zvířat s CCI neměl vliv na spontánní bolest
6. Výsledky měření efektu methylfenidátu se při použití různých metod lišily.

11.1 Efekt CCI na evokovanou bolest

CCI vyvolalo pokles tepelného i mechanického prahu bolesti ipsilaterálních končetin oproti kontralaterálním končetinám také v naší studii. Snížení tepelného a mechanického prahu bolesti interpretujeme jako tepelnou a mechanickou hypersenzitivitu. Naše výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi (Bennett a Xie, 1988; De Vry et al., 2004; Gabay a Tal, 2004; Howard et al., 2005; Zhao et al., 2019). Při porovnání skupiny zvířat CCI s kontrolními zvířaty jsme ale zjistili, že rozdíl mezi zadními končetinami u skupiny CCI byl v případě termálního i mechanického prahu bolesti způsoben nejen poklesem prahu na ipsilaterální končetině, ale také jeho vzestupem na kontralaterální končetině. Pokles na ipsilaterální končetině je tradičně považován za důsledek poškození periferního nervu a vyvolání hypersenzitivity. Zvýšení prahu bolesti na kontralaterální

končetině však dosud popsáno nebylo. Domníváme se, že by mohlo být vysvětleno částečným působením endogenního analgetického systému DNIC (diffuse noxious inhibitory control). DNIC odpovídá za antinociceptivní efekt bolestivé stimulace, jinými slovy aplikace bolestivého stimulu na jednu část těla tlumí bolest také v ostatních částech (Le Bars et al., 1979). Podvaz nervu vyvolává hypersensitivitu, která je podmíněna aktivací aferentních nociceptivních drah (Gabay a Tal, 2004). Proto je možné, že DNIC podobně jako při jiné aktivaci nociceptivního systému může být aktivován také částečně i v případě CCI a může vést ke zvýšení prahu bolesti na kontralaterální končetině.

11.2 Efekt methylnfenidátu na tepelně evokovanou bolest měřenou Hargreavesovým plantar testem

11.2.1 Kontrolní skupina

U kontrolních zvířat methylnfenidát zvýšil tepelný práh bolesti. Tento výsledek je v souladu s předešlou studií (Yamamotová et al., 2016). V jiných pracích však methylnfenidát tento efekt neměl. Např. ve studiích Yangové et al. (2000) a Mohtashamiho Borzadarana et al. (2020) methylnfenidát tepelný práh bolesti neovlivnil. Obě studie však používaly místo plantar testu tepelnou stimulaci ocasu (tail flick test). Rozdílné výsledky mohou být vysvětleny právě použitím jiné metody a působením tepla na jinou část těla. Z pohledu metodiky je důležité, že tail flick test vyžaduje fixaci (imobilizaci) zvířete v testovací komoře, což může u zvířete vyvolat stresovou reakci. Proto výsledky tail flick testu mohou být ovlivněny aktivací stresové analgezie (Carrive et al., 2011). Je tedy pochopitelné, že také efekt podané látky na práh bolesti se může lišit při měření plantar a tail flick testem. Při porovnání tail flick a plantar testu bylo navíc ukázáno, že stejná dávka vyvolá zvýšení prahu bolesti měřeného plantar testem, ale nikoli tail flick testem. Pro vyvolání stejného efektu na ocasu je potom potřeba vyšší dávky (Doležal a Kršiak, 2002). Domníváme se tedy, že výsledky z plantar testu buď

nejdou srovnatelné s výsledky z tail flick testu, nebo při nejmenším nejsou v rozporu.

Zvýšení tepelného prahu po aplikaci methylfenidátu by ani nebylo překvapivé. Bylo totiž opakovaně prokázáno, že jednak methylfenidát působí jako blokátor zpětného vychytávání noradrenalinu (Kuczenski a Segal, 1997; Volkow et al., 2002; Wilens, 2008) a jednak, že zvýšená hladina noradrenalinu má antinociceptivní účinek (Buhler et al., 2005; Basile et al., 2007; Xu et al., 2016). Pokud tedy methylfenidát prodlužuje latenci reflexu oddálení končetiny, odpovídajícím mechanismem může být aktivace spinálních inhibičních interneuronů normálně aktivovaných sestupnými adrenergními drahami.

11.2.2 Skupina CCI

U potkanů s rozvinutou neuropatickou bolestí methylfenidát sice zvýšil tepelný práh bolesti ipsilaterální končetiny, ale rozdíl mezi prahy zadních končetin byl stále signifikantní, takže hlavní kritérium pro termální hypersenzitivitu vyvolanou CCI zůstalo neovlivněno. Jinými slovy řečeno, z výsledků plantar testu vyplývá, že methylfenidát nemá žádný vliv na termální hypersenzitivitu vyvolanou CCI. Antinociceptivní efekt byl ale popsán u zvířat s CCI aplikací inhibitorů zpětného vychytávání monoaminů (Pedersen et al., 2005). I kdyby byly výsledky srovnatelné z pohledu farmakodynamiky, tak lze zřejmě rozdílnost výsledků vysvětlit dávkováním. Ve studii Pedersena et al. (2005) bylo totiž uvedeno, že zvýšení tepelných prahů bolesti se lišilo v závislosti na aplikační dávce. Domníváme se tedy, že tyto výsledky nemusí být v rozporu s naším nálezem.

Také je zajímavé, že na kontralaterální končetině nedošlo po aplikaci ke změně v prahu bolesti. To by mohlo znamenat, že mechanismus odpovědný za zvýšení prahu bolesti je u této končetiny již zasycen. Předěšlé studie potvrzují, že noradrenergní signalizace tvoří významnou složku DNIC (Bannister et al., 2015). Vezmeme-li v úvahu, že methylfenidát je inhibitor dopaminového a noradrenergního zpětného vychytávání, můžeme spekulovat, že naše výsledky

podporují jak zapojení noradrenalinu do DNIC, tak odpovědnost tohoto systému za zvýšení prahu na kontralaterální končetině. Noradrenergická dráha je na kontralaterální končetině u CCI potkanů již aktivní a proto další exogenní přidání nevede ke zvýšení prahu bolesti. Tomuto závěru by odpovídal i náš výsledek ukazující, že práh kontrolní skupiny po aplikaci methylfenidátu je úplně stejný jako práh kontralaterální končetiny u skupiny CCI, ať už před, nebo po aplikaci methylfenidátu.

11.3 Efekt methylfenidátu na tepelně evokovanou bolest měřenou metodou TPP

V naší studii CCI vyvolalo zkrácení délky pobytu na studené ploténce. Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi (Vierck et al., 2005; Salte et al., 2016; Caporoso et al., 2020). Kratší pobyt na studené ploténce u zvířat s CCI můžeme chápat buď jako tepelnou preferenci, anebo jako projev chladové alodynie. Studie Salteho et al. (2016) však neprokázala preferenci pro teplou ploténku při srovnání s neutrální ploténkou u potkanů s CCI. Proto kratší pobyt na studené ploténce interpretujeme jako projev chladové alodynie. Z těchto výsledků je tedy zřejmé, že CCI nevyvolalo pouze změny na míšní úrovni (ovlivnění míšních reflexů), ale vyvolalo i změny vyžadující zpracování informace vyššími etážemi mozku.

11.3.1 Kontrolní skupina

V naší studii jsme metodou TPP u kontrolních zvířat po aplikaci methylfenidátu změnu v teplotní preferenci neprokázali. Efekt methylfenidátu metodou TPP u kontrolních zvířat nebyl v žádné studii testován. Mohtashami Borzadaran et al. (2020) ve své studii měřili efekt methylfenidátu na tepelný práh bolesti u potkanů hot plate testem. Hot plate test obdobně jako metoda TPP vyžaduje zapojení supraspinálních struktur. Práh bolesti (doba strávená na ploténce až do olizování tlapky), se lišil v závislosti na pohlaví potkanů. U samců

methylyfenidát neovlivnil práh bolesti, zatím co u samic se dokonce tepelný práh bolesti po aplikaci methylyfenidátu snížil. Antinociceptivní účinek blokátorů zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu při použití hot plate testu nebyl prokázán ani ve studii Ardida et al. (1992). Tyto výsledky jsou v souladu s tvrzením, že u zdravých kontrol má noradrenergní systém jen malou roli v regulaci systému bolesti (Pertovaara, 2013).

11.3.2 Skupina CCI

TPP není zatím příliš zavedenou metodou pro hodnocení účinku analgetik, proto efekt methylyfenidátu na teplotní preferenci nebyl v žádné studii testován. Avšak metoda TPP byla u modelu CCI využita ve studii Salteho et al. (2016) a Caporoso et al. (2020). Tyto studie prokázaly metodou TPP eliminaci efektu CCI baklofenem, morfinem a pregabalinem. V naší studii u zvířat s CCI methylyfenidát prodloužil délku pobytu na studené ploténce a eliminoval tak chladovou alodynii vyvolanou CCI. Potlačení chladové alodynii methylyfenidátem může být vysvětleno jeho antialodynickým účinkem pravděpodobně vyvolaným potenciací monoaminergní signalizace. Ve studii Balayssaca et al. (2014) byl metodou TPP testován efekt duloxetinu. Duloxetin podobně jako methylyfenidát ovlivňuje monoaminový systém. Na rozdíl od naší studie Balayssac et al. (2014) použil modifikovanou metodu TPP s neutrální (25°C) a studenou ploténkou (20°C). Pro testování efektu duloxetinu byla akutní bolest vyvolána aplikací oxaliplatiny, která vyvolala zkrácení doby pobytu na studené ploténce. Duloxetin prodloužil pobyt na studené ploténce a potlačil tak chladovou alodynii obdobně jako methylyfenidát v naší studii (Balayssac et al., 2014).

11.4 Efekt methylfenidátu na mechanicky evokovanou bolest měřenou vonFreyovým testem

11.4.1 Kontrolní skupina

Je zajímavé, že u kontrolních zvířat jsme antinociceptivní účinek methylfenidátu neprokázali. Antinociceptivní efekt byl ale popsán jak u metamfetaminu (Siemian et al., 2017), tak u vysoce selektivního inhibitoru noradrenergního transportéru (Nielsen et al., 2005). Domníváme se, že rozdílnost výsledků lze vysvětlit dávkováním. Pro vyvolání podobného účinku je třeba vyšší dávky methylfenidátu než specifického inhibitoru jako ve studii Nielsena et al. (2005). Také ve studii Siemiana et al. (2017) byla minimální antinociceptivní dávka metamfetaminu 5,6 mg/kg, zatímco dávka 3,2 mg/kg antinocicepci nevyvolala. Domníváme se tedy, že tyto výsledky nemusí být v rozporu s naším nálezem.

11.4.2 Skupina CCI

Zjistili jsme, že methylfenidát zcela eliminoval projevy rozvinuté neuropatické bolesti. To je podpořené všemi nálezy: i) práh ipsilaterální a kontralaterální končetiny se po aplikaci methylfenidátu nelišil, ii) rozdíl prahu se po methylfenidátu významně snížil, iii) rozdíl prahu se u skupiny CCI po methylfenidátu nelišil od kontrolní skupiny a iv) práh bolesti na ipsilaterální končetině stoupl a na kontralaterální končetině klesl. Tyto nálezy ukazují na specifický antialodynický účinek methylfenidátu. Vezmeme-li v úvahu, že methylfenidát působí jako blokátor zpětného vychytávání noradrenalinu (Kuczenski a Segal, 1997; Volkow et al., 2002; Wilens, 2008), a že látky blokující NET zvyšují mechanický práh bolesti u modelu CCI (Nielsen et al., 2005; Murai et al., 2014) není antialodynický efekt methylfenidátu překvapující. Antialodynický efekt methylfenidátu ale nebyl potvrzen u jiného modelu bolesti – unilaterální artritidy vyvolané CFA (You et al., 2020). Model unilaterální artritidy je modelem zánětlivé

chronické bolesti nikoli bolesti neuropatické. Navíc v této studii byla použita velmi nízká dávka methylfenidátu (0,25 mg/kg, tj. čtvrtinová oproti námi aplikované). U chronické bolesti a látek potencujících monoaminergní signalizaci byl prokázán na dávce závislý efekt (Lunn et al., 2014; Tamano et al., 2016). Proto se domníváme, že jeho výsledky nemusí být v rozporu s tvrzením, že methylfenidát má antialodynický účinek.

11.5 Efekt methylfenidátu na spontánní bolest

Metodou CPP jsme opět hodnotili preferenci pro methylfenidát jak u kontrolní skupiny, tak u potkanů s CCI. Zapojení kontrolní skupiny mělo odhalit, do jaké míry methylfenidát sám o sobě vyvolává preferenci. V několika studiích (Volkow et al., 2005; Engert a Pruessner, 2008; Broussard et al., 2019) bylo prokázáno, že methylfenidát zvyšuje hladinu dopaminu a stimuluje tak centrum odměny v mozku. Proto je překvapující, že u kontrolní skupiny preference pro methylfenidát nebyla vyvolána. V souladu s našimi výsledky je pozorování Cumminse et al. (2013), který použil stejnou aplikační dávku, a preference rovněž nebyla vyvolána. Ani Sellings et al. (2006) při použití dávky 2 mg/kg neprokázal preferenci pro methylfenidát, zatím co aplikační dávka 3 mg/kg již preferenci vyvolala (Wooters, et al., 2011). Preference pro methylfenidát byla vyvolána i aplikační dávkou 5 mg/kg (Sellings et al., 2006; Cumminse et al., 2013). Můžeme tedy uzavřít, že vyvolání preference je závislé na aplikační dávce. Námi použitá aplikační dávka je tedy natolik nízká, že nevyvolává výrazný efekt odměny.

V další části naší studie jsme ukázali, že preference pro methylfenidát nebyla vyvolána ani u skupiny CCI. Tento výsledek může být vysvětlen buď absencí efektu methylfenidátu na spontánní bolest, nebo absencí spontánní bolesti u modelu CCI.

Účinek methylfenidátu u zvířat s CCI metodou CPP dosud nikdo netestoval. You et al. (2020) však ukázal, že nižší dávka methylfenidátu nemá žádný vliv

na preferenci u jiného modelu bolesti. Ve své studii použil čtvrtinovou dávku methylfenidátu (0,25 mg/kg) a model CFA.

Případný efekt methylfenidátu na spontánní bolest tedy vyžaduje další výzkum nebo zapojení jiných metod. Spontánní bolest u zvířat je kromě operantní metody CPP často posuzovaná i mírou pohybové aktivity. You et al. (2020) uvádí, že methylfenidát neovlivnil celkovou pohybovou aktivitu potkanů s CFA.

Alternativním vysvětlením nevyvolání preference pro methylfenidát u potkanů s CCI je absence spontánní bolesti u tohoto modelu. Avšak několik studií (Bennett a Xie, 1988; Attal et al., 1990) tvrdí, že spontánní bolest je u modelu CCI přítomná. Originální studie Benetta a Xieho (1988), která model popsala, připisuje náhlé zvednutí, zvýšenou péči a odlišné držení ipsilaterální končetiny a zpomalení přírůstku hmotnosti právě spontánní bolesti. V rozporu je studie Dalma et al. (2015), který uvedl, že model neuropatické bolesti CCI nemá spontánní složku bolesti a z tohoto důvodu by neměl být používán pro evaluaci efektu léčby neuropatické bolesti. Po aplikaci lokálního anestetika potkanům s CCI nedošlo ke změně preference. Dalm et al. (2015) testoval u potkanů s CCI velikost a prevalenci spontánní aktivity neuronů míšního rohu vyskytující se u spontánní bolesti. Spontánní aktivita neuronů míšních rohů se ve skupině CCI nelišila od falešně operovaných potkanů. Absenci spontánní bolesti u modelu CCI také potvrzuje 16denní výzkum myši s bolestí modelovanou CCI. Tato studie zaměřená na kvalitu života laboratorních zvířat s neuropatickou bolestí, uvedla absenci rozdílů v krmení, pití a pohybové aktivitě mezi kontrolní skupinou a skupinou CCI. Prvních 14 dní po operaci zvířata s CCI byla sice méně aktivní, ale po dvou týdnech byla aktivita zvířat stejná jako u kontrolní skupiny. Tyto výsledky podporují teorii, že CCI může pouze rozvíjet přetrvávající hypersenzitivitu a že nemá vyjádřenou spontánní bolest. Animální model CCI proto nemusí plně korelovat s neuropatickou bolestí u lidských pacientů (Urban et al., 2011).

Přítomnost spontánní bolesti u modelu CCI zůstává dosud neobjasněna. Kingová et al. (2009) prokázala přítomnost spontánní bolesti u modelu SNL.

SNL modeluje chronickou bolest vyvolanou ligací míšních nervů L5 a L6. Ve své studii aplikovala klonidin (i.t.), který je znám, že u lidí tlumí právě spontánní bolest. Metodou CPP byla prokázána preference pro komoru párovanou s klonidinem a tím potvrzena přítomnost spontánní bolesti u tohoto modelu. Pro vyřešení dosud nezodpovězené otázky přítomnosti spontánní bolesti u modelu CCI by se budoucí studie mohly zaměřit na použití klonidinu a zjištění, zda vyvolá preferenci v CPP.

11.6 Porovnání reflexních a operantních metod při hodnocení efektu methylnfenidátu

Naše výsledky ukazují, že hodnocení účinku methylnfenidátu na evokovanou bolest závisí na použité metodě. Zatím co u skupiny s neuropatickou bolestí methylnfenidát působí antialodynicky a eliminuje symptomy vyvolané CCI pouze při měření metodami TPP a vonFrey, u kontrolní skupiny methylnfenidát působí antinociceptivně jen při použití metody plantar testu.

Antinociceptivní a antialodynický efekt methylnfenidátu lze snadno vysvětlit. V několika studiích bylo prokázáno, že zvýšené uvolňování noradrenalinu v locus coeruleus, které je součástí descendentního antinociceptivního systému, může potlačit bolestivé vnímání (Sajedianfard et al., 2005; Basile et al., 2007; Buhler et al., 2008; Xu et al., 2016). Chronické bolesti jsou často spojovány se změnami těchto sestupných modulačních systémů. Zapojením noradrenergního systému u neuropatické bolesti se zabývala studie Alba-Delgado et al. (2016). Tato studie ukázala týden po operaci CCI sníženou aktivitu jádra locus coeruleus. Po poranění periferních nervů byla také prokázána snížená aktivita systému DNIC. Studie Bannistera et al. (2015) uvedla, že potenciace monoaminového systému může zvýšit DNIC a podílet se tak na modulaci chronické bolesti. Několik studií uvedlo, že látky potencující noradrenergní systém blokací NET potlačily bolest vyvolanou CCI (Nielsen et al., 2005; Zhang et al., 2016; Mi et al., 2017). Pokud vezmeme v úvahu, že methylnfenidát potencuje noradrenergní systém, není jeho

antinociceptivní ani antialodynický efekt překvapující. My jsme ale pozorovali buď antinociceptivní (plantar test), nebo antialodynický (vonFreyův test a metoda TPP) účinek methylfenidátu.

Při rozhodování, které výsledky nejsou zatíženy chybou, jsme vycházeli z těchto tří dřívějších zjištění: 1) plantar test je ovlivněn teplotou kůže (Vítková et al., 2015); 2) vonFreyův test je ovlivněn opakovaným měřením (Chaplan et al., 1994) a 3) TPP, i když bylo použito v minimu studií, má největší shodu s pozorováním u lidí (Vierck a spol., 2005; Salte a spol., 2016; Caporoso et al., 2020). Proto si myslíme, že nízká dávka methylfenidátu sice nemá antinociceptivní účinek u kontrolních zvířat ale má antialodynický účinek u zvířat s CCI. Přítomnost antinociceptivního účinku byla pozorovaná pouze při použití metody plantar test.

Domníváme se, že výsledky plantar testu lze vysvětlit právě změnou teploty kůže. V naší studii jsme sice vliv methylfenidátu na teplotu neměřili, ale vlivem methylfenidátu na tělesnou teplotu potkanů se zabývalo několik studií, jejichž výsledky nejsou jednotné. Několik studií (Yehuda et al., 1981; Yang et al., 2000; Hetzler et al., 2014) uvádí, že methylfenidát vyvolává snížení tělesné teploty, jiné např. studie Scheel-Krügera a Hasselagera (1974), naopak prokazují hypertermii indukovanou methylfenidátem. Z pohledu plantar testu je však důležitější teplota kůže. Teplota kůže končetin totiž negativně koreluje s tepelným prahem bolesti měřeným pomocí plantar testu (Vítková et al., 2014). A právě snížení teploty pokožky vyvolané aplikací methylfenidátu bylo prokázáno u lidí ve studii Zahna (1975). Snížení teploty pokožky bylo prokázáno také u jiných látek zvyšujících hladinu monoaminů, např. u metamfetaminu (Mendelson et al., 2006). Nelze tedy vyloučit, že methylfenidát neprodlouží práh u kontrolních zvířat pouhým snížením teploty kůže. Tomu by odpovídaly i výsledky získané u skupiny s CCI. Methylfenidát zvýšil práh ipsilaterální končetiny, neměl ale vliv na termální práh na kontralaterální končetině. Důležité je si uvědomit, že CCI samo o sobě vyvolává vzestup teploty na ipsilaterální končetině a že tento vzestup je nejméně z poloviny odpovědný za snížení prahu tepelné bolesti měřeného pomocí plantar testu (Voděrová et al., 2020). Pokud tedy methylfenidát sníží teplotu ipsilaterální

končetiny, stoupá její tepelný práh bolesti, jak jsme po aplikaci methylfenidátu pozorovali.

Výsledky reflexních testů mohou být vedle teploty také ovlivněny několika dalšími faktory. V naší studii mluvíme o ovlivnění prahů bolesti kontralaterálních končetin aktivací difúzního nocicepčního inhibičního systému u zvířat s CCI. Také Danziger et al. (2001) uvedl, že difúzní nocicepční inhibiční systém je u modelu CCI odpovědný za zvýšení prahů bolesti nejen v bolestivém místě, ale i na ostatních částech těla. Další možné ovlivnění prahů bolesti zmínil ve své studii Tetreault et al. (2011). Uvedl, že zvířata po CCI mají odlišné rozložení váhy zadních končetin. Nižší zatěžování podvázané končetiny může vést ke zkrácení latence a zároveň prodloužení latence na kontralaterální končetině. Také je potřeba brát v úvahu, že plantar test vyvolává pouze únikovou obrannou reakci, která je považována za míšní reflex. Bylo potvrzeno, že u spinalizovaných zvířat se tento obranný reflex zachovává (Kauppila et al., 1998). Plantar test tedy nevyžaduje zapojení supraspinálních struktur a neinformuje o bolestivém pocitu vznikajícím v kortikální oblasti mozku. Z uvedeného nám vyplývá, že plantar test není vhodnou metodou k hodnocení účinnosti látek ovlivňujících neuropatickou bolest.

Naopak operantní metody nám umožňují studovat subjektivní vnímání bolesti zvířete a zpracování bolestivého vjemu nad rámec jeho vrozených reflexivních odpovědí. Ve studii Dattaeho et al. (2010) bylo prokázáno, že chladová alodynie přetrvává dlouho i po vymizení mechanické senzitivity. Ve své studii uvádí, že chladová alodynie je hlavním znakem neuropatické bolesti modelované CCI. Proto považujeme operantní testy vyžadující zapojení afektivně-motivační složky bolesti v porovnání s reflexními testy za spolehlivější ukazatel bolestivosti.

V naší studii jsme prokázali, že methylfenidát v nízké aplikační dávce (1 mg/kg) nepůsobil jako atraktant, ale měl prokazatelný antialodynický účinek. V současném výzkumu neuropatické bolesti je věnováno velké úsilí hledání nových účinných analgetik jako alternativ opioidů a vývoji nových agonistů opioidních receptorů zvyšujících analgezii a snižujících vedlejších účinků morfinu. Ačkoli methylfenidát

především zvyšuje hladinu dopaminu a noradrenalinu v CNS inhibicí zpětného vychytávání, může v dostatečně vysokých dávkách modulovat aktivitu μ opioidního receptoru (Halladay et al., 2009; Zhu et al., 2011). V posledních letech bylo publikováno několik studií kombinované léčby methylfenidátu a morfinu. Studie Youa et al. (2020) hodnotila účinnost methylfenidátu v kombinaci s morfinem u potkanů s chronickou bolestí modelovanou aplikací kompletního Freundova adjuvancia (CFA). Tato studie uvádí, že kombinace morfinu s methylfenidátem zesílila a prodloužila analgetický účinek morfinu. Několik dalších studií potvrdilo zesílení účinku morfinu v kombinované terapii s methylfenidátem (Dalal a Melzack, 1998; Halladay et al., 2009; Yamamotová et al., 2016). V naší studii ale ukazujeme, že samotná aplikace methylfenidátu může být k potlačení hypersenzitivity dostačující a proto by methylfenidát mohl být potencionálním farmakem pro potlačení neuropatické bolesti.

12. Závěr

V této práci jsme u neuropatické bolesti modelované metodou CCI prokázali antialodynický účinek methylfenidátu a poukázali na jeho potenciální využití při léčbě neuropatických bolestivých stavů.

Dále jsme v této práci potvrdili, že použitá aplikační dávka 1 mg/kg methylfenidátu je natolik nízká, že nemá ani antinociceptivní účinek ani nepůsobí jako atraktant.

Naše výsledky také ukazují, že hodnocení účinku methylfenidátu na evokovanou bolest závisí na použité metodě. Uzavíráme, že plantar test není vhodnou metodou k hodnocení účinnosti látek ovlivňující neuropatickou bolest.

V neposlední řadě jsme jako první pozorovali zvýšení prahu na kontralaterální končetině po CCI, které připisujeme částečné aktivaci systému DNIC.

Seznam použité literatury

ADIDA, M a JM AZORIN. Effectiveness of methylphenidate as augmentation therapy after failure of adjunctive neuromodulation for patients with treatment-refractory bipolar depression: a case report. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2014, **10**, 559-562. ISSN 1176-6328. Dostupné z: doi:10.2147/NDT.S58644

ALBA-DELGADO, C, A CEBADA-ALEU, JA MICO a E BERROCOSO. Comorbid anxiety-like behavior and locus coeruleus impairment in diabetic peripheral neuropathy: A comparative study with the chronic constriction injury model. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016, **71**, 45-56. ISSN 02785846. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnpbp.2016.06.007

ALTIER, N a J STEWART. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sciences*. 1999, **65**(22), 2269-2287. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/S0024-3205(99)00298-2

ARDID, D, H MARTY, J FIALIP, AM PRIVAT, A ESCHALIER a J LAVARENNE. Comparative effects of different uptake inhibitor antidepressants in two pain tests in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1992, **6**(2), 75-82. ISSN 07673981. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-8206.1992.tb00097.x

ARGOFF, CE. The Coexistence of Neuropathic Pain, Sleep, and Psychiatric Disorders. *The Clinical Journal of Pain*. 2007, **23**(1), 15-22. ISSN 0749-8047. Dostupné z: doi:10.1097/01.ajp.0000210945.27052.b3

ATTAL, N, F JAZAT, V KAYSER a G GUILBAUD. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain*. 1990, **41**(2), 235-251. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3959(90)90022-6

- BALAYSSAC, D, B LING, J FERRIER, B PEREIRA, A ESCHALIER a N AUTHIER. Assessment of thermal sensitivity in rats using the thermal place preference test. *Behavioural Pharmacology*. 2014, **25**(2), 99-111. ISSN 0955-8810. Dostupné z: doi:10.1097/FBP.0000000000000026
- BANNISTER, K, R PATEL, L GONCALVES, L TOWNSON a AH DICKENSON. Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury. *Pain*. 2015, **156**(9), 1803-1811. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1097/j.pain.0000000000000240
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012, **211**, 39-50. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.041
- BASBAUM, AI, DM BAUTISTA, G SCHERRER a D JULIUS. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 2009, **139**(2), 267-284. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
- BASILE, AS, A JANOWSKY, K GOLEMBIOWSKA, M KOWALSKA, E TAM, M BENVENISTE, P POPIK, A NIKIFORUK, M KRAWCZYK, G NOWAK, PA KRIETER, AS LIPPA, P SKOLNICK a E KOUSTOVA. Characterization of the Antinociceptive Actions of Bicifadine in Models of Acute, Persistent, and Chronic Pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007, **321**(3), 1208-1225. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.106.116483
- BENATTI, C, JMC BLOM, G RIGILLO, S ALBONI, F ZIZZI, R TORTA, N BRUNELLO a F TASCEDDA. *Disease-Induced Neuroinflammation and Depression*. 2016, **15**(4), 414-433. ISSN 18715273. Dostupné z: doi:10.2174/1871527315666160321104749
- BENNETT, GJ a YK XIE. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988, **33**(1), 87-107. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3959(88)90209-6

BOMHOLT, SF, JD MIKKELSEN a G BLACKBURN-MUNRO. Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 2005, **48**(2), 252-263. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2004.09.012

BOURNE, S, AG MACHADO a SJ NAGEL. Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. *Neurosurgery Clinics of North America*. 2014, **25**(4), 629-638. ISSN 10423680. Dostupné z: doi:10.1016/j.nec.2014.06.001

BROUSSARD, E, C REYES-VAZQUEZ a N DAFNY. Methylphenidate dose–response behavioral and neurophysiological study of the ventral tegmental area and nucleus accumbens in adolescent rats. *European Journal of Neuroscience*. 2019, **50**(4), 2635-2652. ISSN 0953-816X. Dostupné z: doi:10.1111/ejn.14402

BUHLER, AV, J CHOI, HK PROUDFIT a GF GEBHART. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain*. 2005, **114**(1), 285-294. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2004.12.031

BURMA, NE, H LEDUC-PESSAH, CY FAN a T TRANG. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *Journal of Neuroscience Research*. 2017, **95**(6), 1242-1256. ISSN 03604012. Dostupné z: doi:10.1002/jnr.23768

CAPOROSO, J, M MOSES, K KOPER, TS TILLMAN, L JIANG, N BRANDON, Q CHEN, P TANG, Y XU. A Thermal Place Preference Test for Discovery of Neuropathic Pain Drugs. *ACS Chemical Neuroscience*. 2020, **11**(7), 1006-1012. ISSN 1948-7193. Dostupné z: doi:10.1021/acscchemneuro.0c00013

CARLTON, SM., PM DOUGHERTY, CM POVER a RE COGGESHALL. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. *Neuroscience Letters*. 1991, **131**(1), 88-92. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3940(91)90343-R

- CARRIVE, P, M CHURYUKANOV a D LE BARS. A reassessment of stress-induced “analgesia” in the rat using an unbiased method. *Pain*. 2011, **152**(3), 676-686. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2010.12.019
- CERVERO, F a JMA LAIRD. Visceral pain. *The Lancet*. 1999, **353**(9170), 2145-2148. ISSN 01406736. Dostupné z: doi: 10.1016/S0140-6736(99)01306-9.
- COLLOCA, L, T LUDMAN, D BOUHASSIRA, R BARON, AH DICKENSON, D YARNITSKY, R FREEMAN, A TRUINI, N ATTAL, NB FINNERUP, C ECCLESTON, E KALSO, DL BENNETT, RH DWORKIN, SN RAJA. Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017, **3**(1). ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2017.2
- CUMMINS, ED, SB GRIFFIN, KC BURGESS, DJ PETERSON, BD WATSON, MA BUENDIA, GD STANWOOD a RW BROWN. Methylphenidate place conditioning in adolescent rats: An analysis of sex differences and the dopamine transporter. *Behavioural Brain Research*. 2013, **257**, 215-223. ISSN 01664328. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbr.2013.09.036
- D’AMOUR, FE a DL SMITH. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1941, **72**(1), 74-79.
- DALAL, S a R MELZACK. Psychostimulant Drugs Potentiate Morphine Analgesia in the Formalin Test. *Journal of Pain and Symptom Management*. 1998, **16**(4), 230-239. ISSN 08853924. Dostupné z: doi:10.1016/S0885-3924(98)00085-2
- DALM, BD, CG REDDY, MA HOWARD, S KANG a TJ BRENNAN. Conditioned place preference and spontaneous dorsal horn neuron activity in chronic constriction injury model in rats. *Pain*. 2015, **156**(12), 2562-2571. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1097/j.pain.0000000000000365
- DANZIGER, N, M GAUTRON, D LE BARS a D BOUHASSIRA. Activation of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Pain*. 2001, **91**(3), 287-296. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3959(00)00451-6

DATTA, S, K CHATTERJEE, RH KLINE a RG WILEY. Behavioral and Anatomical Characterization of the Bilateral Sciatic Nerve Chronic Constriction (bCCI) Injury: Correlation of Anatomic Changes and Responses to Cold Stimuli. *Molecular Pain*. 2010, **6**. ISSN 1744-8069. Dostupné z: doi:10.1186/1744-8069-6-7

DE VRY, J, E KUHL, P FRANKEN-KUNKEL a G ECKEL. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. 2004, **491**(2-3), 137-148. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2004.03.051

DEUIS, JR, LS DVORAKOVA a I VETTER. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017, **10**. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2017.00284

DJOUHRI, L a SN LAWSON. A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews*. 2004, **46**(2), 131-145. ISSN 01650173. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresrev.2004.07.015

DOLEŽAL, T a M KRŠIAK. Augmentation of Analgesic Effect of Ibuprofen by Alprazolam in Experimental Model of Pain. *Physiological Research*. 2002, **51**(2), 179-184. ISSN 0862-8408.

DREVETS, WC, JL PRICE a ML FUREY. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Structure and Function*. 2008, **213**(1-2), 93-118. ISSN 1863-2653. Dostupné z: doi:10.1007/s00429-008-0189-x

ENGERT, V a J PRUESSNER. Dopaminergic and Noradrenergic Contributions to Functionality in ADHD: The Role of Methylphenidate. *Current Neuropharmacology*. 2008, **6**(4), 322-328. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/157015908787386069

FERREIRA, SH a BB LORENZETTI. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology*. 1994, **33**(11), 1479-1485. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/0028-3908(94)90052-3

FIORE, NT a PJ AUSTIN. Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016, **56**, 397-411. ISSN 08891591. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbi.2016.04.012

GABAY, E a M TAL. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain*. 2004, **110**(1), 354-360. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2004.04.021

GREGORY, NS, AL HARRIS, CR ROBINSON, PM DOUGHERTY, PN FUCHS a KA SLUKA. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. *The Journal of Pain*. 2013, **14**(11), 1255-1269. ISSN 15265900. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpain.2013.06.008

HAKL, M a H NEUDERTOVÁ. Neuropatická bolest, její vznik a léčba. *Remedia*. 2015, **25**(4).

HALLADAY, LR, SD IÑIGUEZ, F FURQAN, MC PREVITE, AM CHISUM a CA CRAWFORD. Methylphenidate potentiates morphine-induced antinociception, hyperthermia, and locomotor activity in young adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2009, **92**(1), 190-196. ISSN 00913057. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbb.2008.11.011

HARGREAVES, K, R DUBNER, F BROWN, C FLORES a J JORIS. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988, **32**(1), 77-88. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3959(88)90026-7

HAYTHORNTHWAITE, JA a LM BENRUD-LARSON. Psychological Aspects of Neuropathic Pain. *The Clinical Journal of Pain*. 2000, **16**, S101-S105. ISSN 0749-8047. Dostupné z: doi:10.1097/00002508-200006001-00017

HETZLER, BE, KR MECKEL a BA STICKLE. Methylphenidate alters flash-evoked potentials, body temperature, and behavior in Long-Evans rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014, **116**, 75-83. ISSN 00913057. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbb.2013.11.018

HO KIM, S a J MO CHUNG. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992, **50**(3), 355-363. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3959(92)90041-9

HOWARD, RF, SM WALKER, MP MOTA a M FITZGERALD. The ontogeny of neuropathic pain: Postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. *Pain*. 2005, **115**(3), 382-389. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2005.03.016

HU, B, H DOODS, RD TREEDE a A CECI. Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2-selective agonist GW405833. *Pain*. 2009, **143**(3), 206-212. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2009.02.018

HUSTON, JP, MAS SILVA, B TOPIC a CP MÜLLER. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013, **34**(3), 162-166. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2013.01.004

CHAPLAN, SR, FW BACH, JW POGREL, JM CHUNG a TL YAKSH. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994, **53**(1), 55-63. ISSN 01650270. Dostupné z: doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9

JAGGI, AS, V JAIN a N SINGH. Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2011, **25**(1), 1-28. ISSN 07673981. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x

JENSEN, TS, H GOTTRUP, SH SINDRUP a FW BACH. The clinical picture of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. 2001, **429**(1-3), 1-11. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-2999(01)01302

JULIUS, D a AI BASBAUM. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001, **413**(6852), 203-210. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35093019

KAUPPILA, T, VK KONTINEN a A PERTOVAARA. Influence of spinalization on spinal withdrawal reflex responses varies depending on the submodality of the test stimulus and the experimental pathophysiological condition in the rat. *Brain Research*. 1998, **797**(2), 234-242. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-8993(98)00379-5

KING, T, L VERA-PORTOCARRERO, T GUTIERREZ, TW VANDERAH, G DUSSOR, J LAI, HL FIELDS a F PORRECA. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature Neuroscience*. 2009, **12**(11), 1364-1366. ISSN 1097-6256. Dostupné z: doi:10.1038/nn.2407

KOZÁK, Jiří. Jak zvládnout bolest. *Urologie pro praxi*. 2013, **14**(4).

KUCZENSKI, R a DS SEGAL. Effects of Methylphenidate on Extracellular Dopamine, Serotonin, and Norepinephrine: Comparison with Amphetamine. *Journal of Neurochemistry*. 1997, **68**(5), 2032-2037. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1046/j.1471-4159.1997.68052032.x

LATREMOLIERE, A a CJ WOOLF. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain*. 2009, **10**(9), 895-926. ISSN 15265900. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012

LE BARS, D, M GOZARIU a SW CADDEN, S. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*. 2001, **53**(4), pp. 597-652.

LIU, M a JN WOOD. The Roles of Sodium Channels in Nociception: Implications for Mechanisms of Neuropathic Pain. *Pain Medicine*. 2011, **12**, S93-S99. ISSN 1526-2375. Dostupné z: doi:10.1111/j.1526-4637.2011.01158.x

LUNN, MPT, RAC HUGHES a PJ WIFFEN. Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014, **3**(1). ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD007115.pub3

MAUDERLI, AP, A ACOSTA RUA a CJ VIERCK. An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000, **97**(1), 19-29. ISSN 01650270. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-0270(00)00160-6

MELZACK R a PD WALL. Pain Mechanisms: A new Theory. *Survey of Anesthesiology*. 1967;**11**(2):89–90.

MENDELSON, J, N UEMURA, D HARRIS, R NATH, E FERNANDEZ, P JACOBIII, E EVERHART a R JONES. Human pharmacology of the methamphetamine stereoisomers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006, **80**(4), 403-420. ISSN 00099236. Dostupné z: doi:10.1016/j.clpt.2006.06.013

MI, W, S WANG, Z YOU, G LIM, MF MCCABE, H KIM, L CHEN a J MAO. Nortriptyline Enhances Morphine-Conditioned Place Preference in Neuropathic Rats. *Anesthesia & Analgesia*. 2017, **125**(3), 1032-1041. ISSN 0003-2999. Dostupné z: doi:10.1213/ANE.00000000000002128

MICHAELIS, M., HJ HÄBLER a W JÄNIG. SILENT AFFERENTS: A SEPARATE CLASS OF PRIMARY AFFERENTS? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1996, **23**(2), 99-105. ISSN 0305-1870. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1681.1996.tb02579.x

MILLAN, MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 2002, **66**(6), 355-474. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-0082(02)00009-6

MOGIL, JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009, **10**(4), 283-294. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn2606

MOHTASHAMI BORZADARAN, F, K ESMAEILPOUR, S JOUSHI, MA RAJIZADEH, V SHEIBANI, N REHMAN a G SEPEHRI. What are the consequences of Methylphenidate exposure for maternally separated rats? *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2020, **80**(6), 489-499. ISSN 0736-5748. Dostupné z: doi:10.1002/jdn.10045

MURAI, N, T AOKI, S TAMURA, T SEKIZAWA, S KAKIMOTO, M TSUKAMOTO, T OE, R ENOMOTO, N HAMAKAWA a N MATSUOKA. AS1069562, the (+)-Isomer of Indeloxazine, Exerts Analgesic Effects in a Rat Model of Neuropathic Pain with Unique Characteristics in Spinal Monoamine Turnover. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014, **348**(3), 372-382. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.113.208686

NIELSEN, CK, RJ LEWIS, D ALEWOOD, R DRINKWATER, E PALANT, M PATTERSON, TL YAKSH, D MCCUMBER a MT SMITH. Anti-allodynic efficacy of the χ -conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain*. 2005, **118**(1), 112-124. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2005.08.002

NICHOLSON, B a S VERMA. Comorbidities in Chronic Neuropathic Pain. *Pain Medicine*. 2004, **5**, S9-S27. ISSN 1526-2375. Dostupné z: doi:10.1111/j.1526-4637.2004.04019.x

PANUŠKOVÁ, K. *Reflexní měření termální hyperalgie u modelu neuropatické bolesti*. Praha, 2019. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce Vaculín Šimon.

PEDERSEN, LH, AN NIELSEN a G BLACKBURN-MUNRO. Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. *Psychopharmacology*. 2005, **182**(4), 551-561. ISSN 0033-3158. Dostupné z: doi:10.1007/s00213-005-0120-6

PERTOVAARA, A. The noradrenergic pain regulation system: A potential target for pain therapy. *European Journal of Pharmacology*. 2013, **716**(1-3), 2-7. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2013.01.067

PUD, D, E BROITMAN, O HAMEED, E SUZAN, J AVIRAM, M HADDAD, S HADAD, R SHEMESH a E EISENBERG. Methylphenidate attenuates the response to cold pain but not to aversive auditory stimuli in healthy human: a double-blind randomized controlled study. *PAIN Reports*. 2017, **2**(3). ISSN 2471-2531. Dostupné z: doi:10.1097/PR9.0000000000000593

ROESKA, K, H DOODS, K ARNDT, RD TREEDE a A CECI. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. *Pain*. 2008, **139**(2), 349-357. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2008.05.003

SAJEDIANFARD, J, S KHATAMI, S SEMNANIAN, N NAGHDI a M JORJANI. In vivo measurement of noradrenaline in the locus coeruleus of rats during the formalin test: A microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*. 2005, **512**(2-3), 153-156. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2005.02.032

SALTE, K, G LEA, M FRANĚK a S VACULÍN. Baclofen Reversed Thermal Place Preference in Rats With Chronic Constriction Injury. *Physiological Research*. 2016, **65**(2), 349-355. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933008

SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiological Reviews*. 2009, **89**(2), 707-758. Dostupné z: doi: 10.1152/physrev.00025.2008. ISSN 0031-9333.

SELLINGS, LHL, LE MCQUADE a PBS CLARKE. Characterization of dopamine-dependent rewarding and locomotor stimulant effects of intravenously-administered methylphenidate in rats. *Neuroscience*. 2006, **141**(3), 1457-1468. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.040

SELTZER, Z, R DUBNER a Y SHIR. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990, **43**(2), 205-218. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi: 10.1016/0304- 3959(90)91074-S.

SCHEEL-KRÜGER, J a E HASSELAGER. Studies of various amphetamines, apomorphine and clonidine on body temperature and brain 5-hydroxytryptamine metabolism in rats. *Psychopharmacologia*. 1974, **36**(3), 189-202. ISSN 0033-3158. Dostupné z: doi:10.1007/BF00421801

SCHMIDT, R, M SCHMELZ, C FORSTER, M RINGKAMP, E TOREBJORK a H HANDWERKER. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *The Journal of Neuroscience*. 1995, **15**(1), 333-341. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.15-01-00333.1995

SIEMIAN, JN, Z XUE, BE BLOUGH a JX LI. Comparison of some behavioral effects of d- and l-methamphetamine in adult male rats. *Psychopharmacology*. 2017, **234**(14), 2167-2176. ISSN 0033-3158. Dostupné z: doi:10.1007/s00213-017-4623-8

STEMKOWSKI, PL, PA SMITH, C TOTH a D MOULIN. An overview of animal models for neuropathic pain. *Neuropathic Pain*. Cambridge: Cambridge University Press, 2013, 33-50. ISBN 9781139152211. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781139152211.005

TAMANO, R, M ISHIDA, T ASAKI, M HASEGAWA a S SHINOHARA. Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neuroscience Letters*. 2016, **615**, 78-82. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2016.01.025

TAPPE-THEODOR, A a R KUNER. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents - challenges and opportunities. *European Journal of Neuroscience*. 2014, **39**(11), 1881-1890. ISSN 0953816X. Dostupné z: doi:10.1111/ejn.12643

- TENA, B, B ESCOBAR, MJ ARGUIS, C CANTERO, J RIOS a C GOMAR. Reproducibility of Electronic von Frey and von Frey Monofilaments Testing. *The Clinical Journal of Pain*. 2012, **28**(4), 318-323. ISSN 0749-8047. Dostupné z: doi:10.1097/AJP.0b013e31822f0092
- TÉTREAULT, P, MA DANSEREAU, L DORÉ-SAVARD, N BEAUDET a P SARRET. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiology&Behavior*. 2011, **104**(3), 495-502. ISSN 00319384. Dostupné z: doi:10.1016/j.physbeh.2011.05.015
- TORTA, R, V IERACI a F ZIZZI. A Review of the Emotional Aspects of Neuropathic Pain: From Comorbidity to Co-Pathogenesis. *Pain and Therapy*. 2017, **6**(S1), 11-17. ISSN 2193-8237. Dostupné z: doi:10.1007/s40122-017-0088-z
- TREEDE, RD, DR KENSHALO, RH GRACEY a AKP JONES. The cortical representation of pain. *Pain*. 1999, **79**(2), 105-111. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3959(98)00184-5
- TREISTER, R, E EISENBERG, N DEMETER a D PUD. Alterations in Pain Response are Partially Reversed by Methylphenidate (Ritalin) in Adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Pain Practice*. 2013, **15**(1), 4-11. ISSN 15307085. Dostupné z: doi:10.1111/papr.12129
- TURNER, PV, DSJ PANG a JLS LOFGREN. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. *Comparative Medicine*. 2019, **69**(6), 451-467. ISSN 1532-0820. Dostupné z: doi:10.30802/AALAS-CM-19-000042
- URBAN, R, G SCHERRER, EH GOULDING, LH TECOTT a AI BASBAUM. Behavioral indices of ongoing pain are largely unchanged in male mice with tissue or nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Pain*. 2011, **152**(5), 990-1000. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/j.pain.2010.12.003

VIERCK, CJ, A ACOSTA-RUA, R NELLIGAN, N TESTER a A MAUDERLI. Low dose systemic morphine attenuates operant escape but facilitates innate reflex responses to thermal stimulation. *The Journal of Pain*. 2002, **3**(4), 309-319. ISSN 15265900. Dostupné z: doi:10.1054/jpai.2002.125186

VIERCK, CJ, AJ ACOSTA-RUA a RD JOHNSON. Bilateral Chronic Constriction of the Sciatic Nerve: A Model of Long-term Cold Hyperalgesia. *The Journal of Pain*. 2005, **6**(8), 507-517. ISSN 15265900. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpain.2005.03.003

VÍTKOVÁ, J, M LOUČKA, J BOČEK a Š VACULÍN. The effect of acclimatization and ambient temperature on heat withdrawal threshold in rats. *European Journal of Pain*. 2015, **19**(1), 21-27. ISSN 10903801. Dostupné z: doi:10.1002/ejp.515

VODĚROVÁ, L, Š ŠANDERA, T DROBIL, B PLEVOVÁ a Š VACULÍN. Skin temperature contribution to the decrease in withdrawal latency following chronic constriction injury. *Physiology&Behavior*. 2020, **227**. ISSN 00319384. Dostupné z: doi:10.1016/j.physbeh.2020.113147

VOLKOW ND, WANG GJ, FOWLER JS, DING YS. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*. 2005;**57**:1410–1415.

VOLKOW, ND, JS FOWLER, G WANG, Y DING a SJ GATLEY. Mechanism of action of methylphenidate: Insights from PET imaging studies. *Journal of Attention Disorders*. 2002, **6**, 31-43. ISSN 1087-0547. Dostupné z: doi:10.1177/070674370200601S05

WALL, PD, M DEVOR, R INBAL, JW SCADDING, D SCHONFELD, Z SELTZER a MM TOMKIEWICZ. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain*. 1979, **7**(2), 103-113. ISSN 0304-3959. Dostupné z: 10.1016/0304-3959(79)90002-2.

WENTHUR, CJ. Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. *ACS Chemical Neuroscience*. 2016, **7**(8), 1030-1040. ISSN 1948-7193. Dostupné z: doi:10.1021/acschemneuro.6b00199

WILENS, TE. Effects of Methylphenidate on the Catecholaminergic System in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2008, **28**(3), S46-S53. ISSN 0271-0749. Dostupné z: doi:10.1097/JCP.0b013e318173312f

WOOLF, CJ a Q MA. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*. 2007, **55**(3), 353-364. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2007.07.016

WOOLF, CJ a SWN THOMPSON. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N -methyl-d-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. 1991, **44**(3), 293-299. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3959(91)90100-C

WOOLFE, G a D MACDONALD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944, **80**(3), 300-307.

WOOTERS, TE, MT WALTON a MT BARDO. Oral methylphenidate establishes a conditioned place preference in rats. *Neuroscience Letters*. 2011, **487**(3), 293-296. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2010.10.040

XU, Y, D LIN, X YU, X XIE, L WANG, L LIAN, N FEI, J CHEN, N ZHU, G WANG, X HUANG a J PAN. The antinociceptive effects of ferulic acid on neuropathic pain: involvement of descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget*. 2016, **7**(15), 20455-20468. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.1007/s11655-018-3057-4

YAMAMOTOVÁ, A a H PAPEŽOVÁ. Patofyziologie vztahu bolesti a deprese. *Psychiatrie pro praxi*. 2010, **11**(3), 110-114.

YAMAMOTOVÁ, A, J FRICOVÁ, R ROKYTA a R ŠLAMBEROVÁ. The Effect of Combined Treatment of Opioids With Methylphenidate on Nociception in Rats and Pain in Human. *Physiological Research*. 2016, S567-S575. ISSN 1802-9973.

Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933535

YANG, P, A SWANN a N DAFNY. NMDA receptor antagonist disrupts acute and chronic effects of methylphenidate. *Physiology & Behavior*. 2000, **71**(1-2), 133-145.

ISSN 00319384. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9384(00)00318-8

YEHUDA, S, Y BEN-URIAH a R CARASSO. A comparison of the hypothermic effects of methylphenidate and d-amphetamine. *International Journal of Neuroscience*. 1981, **13**(2-3), 117-120. ISSN 0020-7454. Dostupné z:

doi:10.3109/00207458109043310

YOU, Z, W DING, JT DOHENY, S SHEN, J YANG, L YANG, L CHEN, S ZHU a J MAO. Methylphenidate and Morphine Combination Therapy in a Rat Model of Chronic Pain. *Anesthesia & Analgesia*. 2020, **130**(2), 518-524. ISSN 0003-2999.

Dostupné z: doi:10.1213/ANE.0000000000004273

ZAHN, TP. Minimal Brain Dysfunction, Stimulant Drugs, and Autonomic Nervous System Activity. *Archives of General Psychiatry*. 1975, **32**(3). ISSN 0003-990X.

Dostupné z: doi:10.1001/archpsyc.1975.01760210115009

ZHANG, T, R XUE, L ZHU, J LI, Q FAN, B ZHONG, Y LI, C YE a Y ZHANG. Evaluation of the analgesic effects of amoxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2016, **37**(9), 1154-1165. ISSN 1671-4083. Dostupné z: doi:10.1038/aps.2016.45

ZHAO, W, Z JIANG, H SHI, L XU, Y YANG a Y WANG. Low-Frequency Electroacupuncture Alleviates Chronic Constrictive Injury-Induced Mechanical Allodynia by Inhibiting NR2B Upregulation in Ipsilateral Spinal Dorsal Horn in Rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2019, **25**(6), 462-467. Dostupné z: doi: 10.1007/s11655-018-3057-4

ZHU, J, TJ SPENCER, L-Y LIU-CHEN, J BIEDERMAN a PG BHIDE.

Methylphenidate and μ opioid receptor interactions: A pharmacological target for prevention of stimulant abuse. *Neuropharmacology*. 2011, **61**(1-2), 283-292. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2011.04.015

ZIEGLGÄNSBERGER, W, A BERTHELE a TR TÖLLE. Understanding Neuropathic Pain. *CNS Spectrums*. 2005, **10**(4), 298-308. ISSN 1092-8529. Dostupné z: doi:10.1017/S1092852900022628

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983, **16**(2), 109-110. ISSN 0304-3959. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3959(83)90201-4

Knížní zdroje

FRANĚK, M a Š VACULÍN. Animální modely bolesti. Bolest: monografie algeziologie. 2. vyd. Praha: Tegis, 2012, s. 94. ISBN 978-80-87323-02-1

KOZÁK, J. *Léčba chronické bolesti*. Olomouc: Solen, 2010. ISBN 978-80-87327-45-6.

ROKYTA, R. *Bolest a jak s ní zacházet: učebnice pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3012-7.

ROKYTA, R. Transmise bolesti a její centrální projekce (dráhy bolesti). *Bolest monografie algeziologie*. Praha: Tegis, 2012, s. 66-67. ISBN 978-80-87323-02-1.

Web

IASP Terminology. The International Association for the Study of Pain [online]. 2018, [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: <https://www.iasppain.org/terminology?navItemNumber=576>

IASP's Proposed New Definition of Pain Released for Comment. The International Association for the Study of Pain [online]. 2018 [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsDetail.aspx?ItemNumber=9218>

Pain Pathophysiology and Management [online]. J MARKMAN. Clinical Gate, 2015 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://clinicalgate.com/pain-pathophysiology-and-management/>

SÚKL: státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha, 2010 [cit. 2021-03-05]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/>